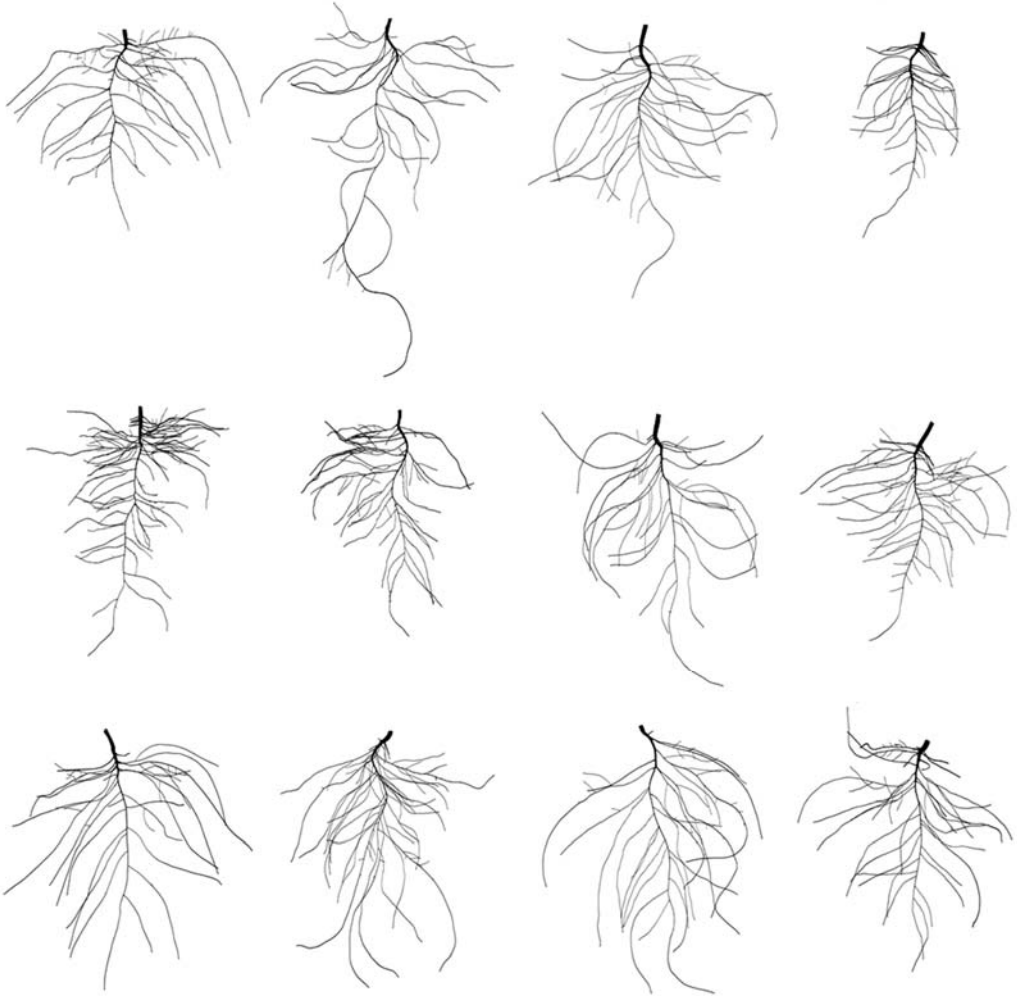


TESIS DOCTORAL

Variabilidad natural de caracteres morfológicos y fisiológicos de la raíz de tomate: implicaciones en la mejora de la eficiencia del uso del agua



MARINA RAMÍREZ TOLEDO

Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias

Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada
2015

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Directores: M^a Remedios Romero Aranda
José Juan Reina Pinto



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Marina Ramírez Toledo

 <http://orcid.org/0000-0002-4296-1497>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

**Variabilidad natural de caracteres morfológicos y
fisiológicos de la raíz de tomate: implicaciones en la
mejora de la eficiencia del uso del agua**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología

Marina Ramírez Toledo

para optar al grado de

Doctora en Biología por la Universidad de Málaga

Directores:

Dra. M^a Remedios Romero Aranda

Dr. José Juan Reina Pinto

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”

(IHSM-UMA-CSIC)

Málaga, Noviembre de 2015



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

María Remedios Romero Aranda, Doctora en Ciencias (Biología) y Científico Titular del Departamento de Mejora Genética y Biotecnología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, instituto de carácter mixto entre la Universidad de Málaga y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC) y **José Juan Reina Pinto**, Doctor en Ciencias (Biología) e investigador contratado del mismo departamento e instituto,

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada **“Variabilidad natural de caracteres morfológicos y fisiológicos de la raíz de tomate: implicaciones en la mejora de la eficiencia del uso del agua”**, que presenta la Licenciada en Biología, Marina Ramírez Toledo, para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente escrito en Algarrobo-Costa a noviembre de 2015.

Fdo.: M^a Remedios Romero Aranda

Fdo.: José Juan Reina Pinto



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Antonio Heredia Bayona, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

RATIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **“Variabilidad natural de caracteres morfológicos y fisiológicos de la raíz de tomate: implicaciones en la mejora de la eficiencia del uso del agua”** ha sido realizada por Marina Ramírez Toledo, Licenciada en Biología, para optar al Título de Doctora en Biología, bajo la dirección de los Doctores M^a Remedios Romero Aranda, Científico Titular del IHSM-UMA-CSIC y José Juan Reina Pinto, investigador contratado del mismo instituto.

Dicha tesis se presenta por el programa de doctorado de Biotecnología Avanzada de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firma la presente autorización en Málaga, a noviembre del 2015.

Fdo.: Antonio Heredia Bayona

Tutor de la Tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Mejora Vegetal de la Estación Experimental “La Mayora”, integrada en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, instituto de carácter mixto entre la Universidad de Málaga y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC) gracias a una beca JAE-PREDOC del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en el marco del proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental) “Identificación y explotación de la variabilidad natural en caracteres hídricos y hormonales para mejorar la eficacia del uso de agua en tomate (WUETOM)” (AGL2008-01733).

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo se han publicado y expuestos en:

Revista:

Ramírez-Toledo M, Reina-Pinto J.J, Domínguez-Carmona E.M, Cantero E, Pérez-Alfocea F, Romero-Aranda, M.R, Fernández-Muñoz R (2012). Variación genética de la eficiencia del uso del agua en una población recombinante de tomate. *Actas de Horticultura* 60, 67-70.

Congresos:

Ramírez-Toledo, M, Jurado-Lavado O, Fernández-Muñoz R, Romero-Aranda M.R. Fenotipado de caracteres de la raíz relacionados con la eficiencia del uso del agua en una población RIL de tomate. VII Congreso de Mejora Genética de Plantas. Zaragoza. Septiembre, 2014.

Ramírez-Toledo M, Reina-Pinto J.J, Fernández-Muñoz R, Romero-Aranda M.R. Root morphological and physiological traits in selected tomato recombinant inbred lines that differ in plant water consumption. Workshop Genomic, physiological and breeding approaches for enhancing drought resistance in crops. Jaén. Septiembre, 2013.

Fernández-Muñoz R, Ramírez-Toledo M, López-Casado G, Romero-Aranda M.R. Traits that control water balance in tomato plant studied in recombinant inbred and introgression line populations from wild species relatives. Workshop Genomic, physiological and breeding approaches for enhancing drought resistance in crops. Jaén. Septiembre, 2013.

Ramírez-Toledo M, Reina-Pinto J.J, Domínguez-Carmona E.M, Cantero E, Pérez-Alfocea F, Romero-Aranda M.R, Fernández-Muñoz R. Variación genética de la eficiencia del uso del agua en una población recombinante de tomate. XIII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Almería. Abril, 2012.

Ramírez-Toledo M, Reina-Pinto J.J, Domínguez-Carmona E.M, Fernández-Muñoz R, Romero-Aranda M.R. Eficiencia en el uso del agua y calidad de la cosecha de un híbrido comercial de tomate injertado sobre líneas seleccionadas de una población RIL de tomate. XIII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Almería. Abril, 2012.

Ramírez-Toledo M, Reina-Pinto J.J, Domínguez-Carmona E.M, Fernández-Muñoz R, Romero-Aranda M.R. Interspecific variation of tomato night-time transpiration and leaf morphological features in relation with plant water use efficiency. XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal-XII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal. Castellón. Junio, 2011.

Ramírez-Toledo M, Cantero E, Jurado-Lavado O, Reina-Pinto J.J, Fernández-Muñoz R, Pérez-Alfocea F, Romero-Aranda, M.R Genetic variation of plant water status in a recombinant inbred population of tomato in relation with biomass production. XVIIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Tomato. Málaga. Abril, 2011.

Cantero E, Ramírez-Toledo M, Albacete A, Dodd I.C, Fernández Muñoz R, Romero-Aranda M.R, Pérez-Alfocea, F. WUETOM: A rootstock-mediated approach to improve water use efficiency in tomato. XVIIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Tomato. Málaga. Abril, 2011.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Echo la vista atrás y creo que no tengo palabras suficientes para agradecer a todas aquellas personas que, de un modo u otro, me han ofrecido su ayuda para poder terminar este trabajo que es fruto de un gran esfuerzo y dedicación.

En primer lugar quisiera agradecer a mi directora de tesis, la Dra. M^a Remedios Romero Aranda (Merce en el día a día), la oportunidad de poder trabajar en este proyecto. Gracias por todo el aprendizaje y la formación que he ido adquiriendo a lo largo de estos años, por el trato cercano que me hacía sentir como una más de la familia y por tu confianza y paciencia. Ha sido un verdadero placer entrar en tu despacho y ser recibida con una sonrisa.

En segundo lugar, a mi co-director el Dr. José Juan Reina Pinto, por participar en este proyecto y por aguantar a una doctoranda un tanto pesada y preguntona. Gracias por todas tus enseñanzas moleculares y por tu gran ayuda en el trabajo diario. Por tu paciencia, amabilidad, disponibilidad y buen humor en todo momento. Por las grandes charlas que empezaban con ciencia y acaban intentando arreglar el mundo, por poner buena música en el laboratorio y por enseñarme los festivales del futuro.

Agradecer al Dr. Antonio Heredia Bayona tanto su tutorización en este trabajo como la disponibilidad y amabilidad recibida en todo momento.

Al Dr. Wieland Fricke por aceptarme bajo su tutela durante mi estancia en la *University College of Dublin* y por sus enseñanzas en el mundo de la conductividad hidráulica.

Agradecer al Dr. Rafael Fernández Muñoz todos sus consejos y enseñanzas en gran cantidad de ámbitos (especialmente estadísticamente hablando) y por su gran mote “la flequi” que siempre me gustará. A la Dra. Eva M^a Domínguez Carmona, por su sabiduría con los colorantes que me llevaban por la calle de la amargura y por sus buenos consejos y a la Dra. Gloria López Casado por su disposición a escuchar y ayudar en todo momento, ¡Qué nos gusta una

manualidad para despejar la mente! Gracias de corazón a todos, por las palabras de ánimos en los momentos más oportunos. Al resto de doctoras del departamento de Mejora de Genética y Biotecnología, Marisa Gómez-Guillamón, Anabel López-Sesé y Marian Viruel, gracias por vuestra amabilidad durante estos años.

Agradecer a Marina Gil y a Oliva por su esfuerzo y trabajo en la realización de los experimentos. Sin vuestra colaboración sería imposible haber llegado hasta donde estamos hoy. A Inma Díaz, por tu ayuda durante tus prácticas, todo un placer haberte acompañado en tus primeros pasos en La Mayora. A Toñi, Luis y Ana Rico por ayudar a ubicarme en el laboratorio. A Manolo, por atenderme rápidamente y proveer las preciadas semillas. A Severiano, Miguel Ángel, Gonzalo, David, Álvaro y Sara por ser siempre tan amables y por vuestros imprescindibles cuidados de las plantas.

Agradecer la ayuda recibida en el centro BIONAND. A la Dra. María Luisa García la posibilidad de conocer nuevas técnicas como la imagen de resonancia magnética (MRI) y en especial al Dr. John Pearson por su inestimable ayuda en el servicio de microscopía confocal y sus enseñanzas en el ámbito de análisis de imágenes. A los técnicos de Microscopía del SCAI de la Universidad de Málaga, Goyo Martín y David Navas, por su buena disposición y ayuda recibida.

A la Dra. Olga Serra Figueras de la Universidad de Girona por sus consejos con las tinciones de suberina y por haber llevado a cabo junto con su estudiante de grado, Berta Mas Parés, el análisis cualitativo de la suberina presente en nuestras raíces. Al Dr. Niko Geldner de la Universidad de Lausanne por cedernos el Fluorol Yellow y darnos todos los consejos habidos y por haber.

A mis compañeras de cuartito. A Ro y María José, daros las gracias por vuestro apoyo, consejos y por todas las conversaciones compartidas. A Laura España, por darme tan sabios consejos y guiarme en esta etapa como buena prima mayor. No tengo palabras para describir lo bien que me ha sentado tenerte

cerca. A Rida, por traer alegría y entusiasmo cuando el cuartito más lo necesitaba. Gracias por surtirme de *papers* y por las palabras de ánimo. A Inma y Celes por empezar siendo compañeras y acabar siendo grandes amigas. Millones de gracias por todos los bucles vividos, por todos los bailes de ánimo, por todos los abrazos, por sacar siempre el lado positivo de todas las situaciones, por los miles de *papers* pedidos y en definitiva por todo este tiempo compartido. Y por último, pero no menos importante, a Laura Rueda, mi Zipi particular. Nuestros caminos se cruzaron en la facultad pero no fue hasta encontrarte aquí cuando descubrí la gran persona que eres. Gracias Zipi por estos cinco años, por ser tan buena compañera dispuesta siempre a ayudar, por reír y hasta llorar en situaciones insospechadas, pero siempre juntas. Eres todo un ejemplo de esfuerzo y superación y ha sido un placer compartir bancada de despacho y de laboratorio. A todas, gracias, gracias y gracias. No hubiera llegado hasta aquí sin vuestro cariño y sin nuestros desayunos, ¡Vivan los bocadillos de lomo y queso!

A mis compañeros doctorandos y doctores de la Mayora: Caro, Davinia y Lourdes, compañeras de coche (nuestro Gran Hermano particular) en el que hemos compartido tantos kilómetros, risas y anécdotas. Muchas gracias por aceptarme como una más desde el principio. Nunca pensé que a las 8 de la mañana era capaz de reír tanto. A María y Nerea por ser tan majas y *apañás*. A Pao, Willi, Jota, Anabel, Anelise, Yazmín, Isa, Librada, Jorge, Vero, Eli y Paco, gracias por la disposición de ayudar en cualquier momento y por amenizar la hora de la comida.

A los chicos de mantenimiento, Pablo y Pedro, por vuestra disposición a echar un cable en todo momento. A los compañeros de administración y gerencia, Amelia, José Antonio, Juan y Antonio Córdón por echarme una mano en cuanto a la temida burocracia se refiere. A Irene y Olaya, mil gracias por todos los arreglos informáticos que me han salvado más de una vez. A Cañi y Mariola, un placer haber compartido comidas y charlas interesantes con vosotras. Al resto de compañeros de la Mayora, Rosa, María Victoria, Reme,

Rafa Gómez, Rafa “el rubio”, los *niños* del campo, Rocío Camero, Andrea, Antonio, Eduardo, Jero, Domingo, Yoli, Sonia y los que se me quedan en el tintero, gracias por tener siempre una sonrisa de vuelta al cruzarnos por los pasillos y/o laboratorios.

A mis compañeros de Dublín, Ángel, Nuria y Phillip por hacer los días de laboratorio más divertidos. A María, Alberto, Raúl, Silvia, Dani y Jano por enseñarme cómo es la vida dublinesa. Gracias a todos por hacer de la estancia, una experiencia inolvidable que aunque fuera cortita, estuvo más que aprovechada.

A todos mis amigos, por acompañarme en este periodo y ayudarme a levantarme en cada traspie. Al hexágono por vuestro apoyo incondicional y hacerme reír para olvidar las penas. A Dani y Mora, por vuestros grandes consejos. A Javi e Iris, por nuestras incontables charlas telefónicas que me sacaban del agujero más profundo. A Cande por calmarme en los momentos de estrés y animarme siempre a seguir un pasito más. A Paula, David, Nini, Son, Guille, Eva, Bego, Yiyi, Noe, Celia, Amaia, Jaime, Manuela, Elia, Nuria, Ana, Guillermo, Vivi, Ismael y Ramón por estar siempre pendientes. A todos, gracias por las palabras de ánimo y cariño, da gusto tener amigos como vosotros.

A mis padres, por ser el gran ejemplo a seguir. Gracias a vuestro amor, consejos y risas he conseguido llegar a ser la persona que soy. Ni en un millón de años podré compensar todo lo que hacéis por mí. A mi familia por entender que esto de la tesis lleva más tiempo del deseado y en especial a Elvira, por ser un ejemplo de superación. A mi familia política, por tener siempre grandes palabras de apoyo y cariño.

A Rodrigo, por ser el pilar de cada día. Por poner un poco de cordura en todos los momentos difíciles y sacarme una sonrisa hasta en los días más negros. Por tener esa santa paciencia de convivir con una doctoranda en periodo de escritura. Y por supuesto, por hacerme cada día un poco más feliz.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
I.1. Arquitectura y morfología de la planta de tomate.....	9
I.2. Taxonomía, origen y domesticación del tomate	16
I.3. Importancia económica del cultivo de tomate	17
I.3.1. Producción en España	18
I.4. Problemática del cultivo de tomate bajo invernadero en el área mediterránea	21
I.4.1. Estrés hídrico ambiental.....	21
I.4.2. Estacionalidad y duración de los periodos de producción	22
I.4.3. Escasez de los recursos hídricos y salinidad.....	23
I.5. Cultivo hidropónico como estrategia frente a la escasez de agua	25
OBJETIVOS.....	29
CAPÍTULO 1: VARIABILIDAD EN EL CONSUMO DE AGUA Y PRODUCTIVIDAD DEL AGUA EN UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS PURAS RECOMBINANTES DE TOMATE	33
1.1 Introducción	35
1.2. Materiales y Métodos	39
1.2.1. Material vegetal.....	39
1.2.2. Condiciones de cultivo	40
1.2.3. Consumo de agua	42
1.2.4. Parámetros biométricos	43
1.2.5. Producción de biomasa.....	43
1.2.6. Variables de intercambio gaseoso	43
1.2.7. Rendimiento del fotosistema II	44
1.2.8. Contenido relativo de agua.....	45

1.2.9. Cálculo de WUEi y WP	45
1.2.10. Análisis estadístico y cálculo de la heredabilidad	46
1.3. Resultados	48
1.3.1. Consumo de agua	48
1.3.2. Parámetros biométricos	49
1.3.3. Producción de biomasa.....	52
1.3.4. Variables de intercambio gaseoso	54
1.3.5. Rendimiento del fotosistema II	55
1.3.6. Contenido relativo de agua.....	56
1.3.7. Eficiencia transpiratoria (WUEi) y productividad del agua (WP)	57
1.3.8. Relación entre WP y el consumo de agua con los parámetros biométricos y fisiológicos registrados	60
1.3.8.1. Análisis de correlación.....	61
1.3.8.2. Análisis de componentes principales (ACP).....	62
1.3.8.3. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos.....	64
1.3.9. Estimación de la heredabilidad	65
1.4. Discusión.....	67
CAPÍTULO 2: CONDUCTIVIDAD HIDRÁULICA DE LA RAÍZ DE TOMATE	71
2.1. Introducción	73
2.1.1. Movimiento del agua en la planta	73
2.1.2. Movimiento del agua en la raíz	76
2.1.3. Conductividad hidráulica de raíz.....	78
2.2. Materiales y Métodos	81
2.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	81
2.2.2. Determinación de la Lpr en plantas de 21 días de edad	82

2.2.3. Determinación de la Lpr en plantas de 40 días de edad	87
2.2.4. Análisis estadístico	88
2.3. Resultados	89
2.3.1. Lpr en plantas de 21 días de edad	89
2.3.2. Lpr en plantas de 40 días de edad	97
2.4. Discusión	100
CAPÍTULO 3: ARQUITECTURA Y ANATOMÍA INTERNA DE LA RAÍZ DE TOMATE	
3.1. Introducción	107
3.1.1. Arquitectura del sistema radicular	108
3.1.2. Anatomía interna de la raíz	109
3.1.3. Elección del método de estudio	113
3.2. Materiales y métodos	114
3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	114
3.2.2. Determinación de la tasa de elongación del sistema radicular	116
3.2.3. Densidad de ramificación del sistema radicular	117
3.2.4. Anatomía interna de la raíz	118
3.2.4. Análisis estadístico	118
3.3. Resultados	119
3.3.1. Longitud y tasa de elongación del sistema radicular	119
3.3.2. Ramificación del sistema radicular	123
3.3.3. Anatomía interna de la raíz	127
3.4. Discusión	133

CAPÍTULO 4: TRANSPORTE RADIAL DE AGUA EN LA RAÍZ DE TOMATE: ACUAPORINAS Y BIOPOLÍMEROS DE BARRERA 137

4.1. Introducción	139
4.1.1 Acuaporinas en plantas	139
4.1.1.1 Clasificación de las AQP.....	140
4.1.1.2 Estructura molecular de las AQP.....	143
4.1.1.3 Regulación de las AQP.....	145
4.1.1.4 Condiciones ambientales y su efecto en la expresión de AQP.....	149
4.1.1.5 Las AQP en el transporte de agua en la raíz.....	150
4.1.2 Biopolímeros de barrera en la raíz: suberina y lignina.....	152
4.1.2.1 Composición química y localización	153
4.1.2.2 Función en el transporte de agua.....	154
4.2. Materiales y Métodos	157
4.2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	157
4.2.2. Tratamiento de las raíces con HgCl ₂ y DTT	157
4.2.3. Identificación <i>in silico</i> de genes de acuaporinas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>).....	157
4.2.4. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético de las AQP.....	158
4.2.5. Aislamiento y purificación de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc).....	159
4.2.6. Análisis de expresión de AQP mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Real Time qPCR).....	159
4.2.7. Localización de depósitos de lignina y suberina.....	161
4.2.8. Análisis estadístico.....	162
4.2.3. Resultados	163
4.3.1 Acuaporinas.....	163

4.3.1.1 Inhibición del transporte mediado por acuaporinas: efecto del HgCl ₂	163
4.3.1.2 Identificación <i>in silico</i> de acuaporinas de tomate y clasificación filogenética.....	165
4.3.1.3 Cuantificación de la expresión relativa de genes PIP	168
4.3.2 Análisis histológico de los depósitos de biopolímeros de barrera.....	170
4.3.2.1 Análisis histológico de la lignina	170
4.3.2.2 Análisis histológico de la suberina.....	174
4.4. Discusión.....	178
4.4.1 Acuaporinas.....	178
4.4.2 Depósitos de biopolímeros de barrera.....	185
DISCUSIÓN GENERAL	191
CONCLUSIONES GENERALES	197
BIBLIOGRAFÍA.....	203



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

σ_G^2	Varianza genética
σ_E^2	Varianza ambiental
Ψ	Potencial hídrico
$\Psi\pi$	Presión osmótica
$\Psi\tau$	Presión matricial
Ψg	Presión gravitacional
Ψp	Presión de turgencia o hidrostática
$\Delta\Psi$	Gradiente de potencial hídrico
$\Delta\Psi\pi$	Gradiente de presión osmótica
A	Tasa de fotosíntesis
ac	entrada
AH	Contenido de agua en las hojas
Al	Altura de la planta
Ap	Fotosíntesis de toda la planta
AT	Contenido de agua en el tallo
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AQPs	Acuaporinas
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de la varianza
C	Consumo de agua acumulado
Cq	Ciclo de cuantificación (del inglés, <i>quantification cycle</i>)
cv.	cultivar
CRA	Contenido relativo de agua
D	Dimensiones de la raíz
DT	Diámetro del tallo de la planta
DDG	Días después de germinación
dpi	Puntos por pulgadas, (del inglés, <i>dots per inch</i>)
DTT	Ditiotreitol
E	Tasa de transpiración
Ep	Transpiración de toda planta
Fo	Fluorescencia basal
FC	Cantidad relativa de un transcrito con respecto al del gen de referencia (del inglés, <i>Fold Change</i>)
Fm	Fluorescencia máxima

FAOSTAT	Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fv/Fm	Rendimiento del fotosistema II
gs	Conductancia estomática
GIPs	Proteínas intrínsecas similares a GlpF (del inglés, <i>GlpF-like Intrinsic Proteins</i>)
GLM	Modelo lineal generalizado (del inglés, <i>Generalized Linear Model</i>)
gsp	Conductancia estomática de toda la planta
h	altura del exudado en el interior del capilar de vidrio
H ²	Heredabilidad
HIPs	Proteínas intrínsecas híbridas (del inglés, <i>Hybrid Intrinsic Proteins</i>)
Lr	Conductancia hidráulica de la raíz
Lpr	Conductividad hidráulica de la raíz
MIPs	Proteínas intrínsecas principales (del inglés, <i>Mayor Intrinsic Proteins</i>)
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
NH	Número de hojas
NIPs	Proteínas intrínsecas de membrana similares a la Nodulina 26 (del inglés <i>Nodulin 26-like Intrinsic Proteins</i>)
p	Probabilidad
pb	Pares de bases
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
PT	Peso de saturación o de turgor máximo
p/v	peso/volumen
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PIPs	Proteínas intrínsecas de membrana plasmática (del inglés, <i>Plasma membrane Intrinsic Proteins</i>)
PFae	Peso fresco de la parte aérea
PSae	Peso seco de la parte aérea
PSR	Peso seco de la raíz
Q	Tasa de flujo de agua
RILs	Líneas puras recombinantes (del inglés, <i>Recombinant Inbred Lines</i>)
RPKM	Lecturas por kilobase y por millón de lecturas mapeadas (del inglés, <i>Reads Per Kilobase per Million mapped reads</i>)
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SE	Error estándar (del inglés, <i>Standard Error</i>)
SF	Superficie foliar
SDD	Método de descendiente único (del inglés, <i>Single Seed Descend</i>)

SGN	Base de datos <i>Sol Genomics Network</i>
SIPs	Proteínas intrínsecas pequeñas (del inglés, <i>Small Intrinsic Proteins</i>)
TFG	Base de datos <i>Tomato Functional Genomics</i>
TIPs	Proteínas intrínsecas del tonoplasto (del inglés, <i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i>)
VE	Volumen de exudado
WP	Productividad del agua (del inglés, <i>Water Productivity</i>)
WUE	Eficiencia del uso del agua (del inglés, <i>Water Use Efficiency</i>)
WPPF	Productividad del agua en base al peso fresco de la parte aérea
WPPS	Productividad del agua en base al peso seco de la parte aérea
WUEa	Eficiencia del uso del agua desde el punto de vista agronómico
WUEi	Eficiencia del uso del agua desde el punto de vista fisiológico
XIPs	Proteínas intrínsecas no categorizadas (del inglés, <i>uncategorized X Intrinsic Proteins</i>)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE FIGURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Sistema radicular de la planta de tomate donde se detallan las distintas raíces que lo conforman.	10
Figura I.2. Sección transversal de una raíz de tomate con crecimiento secundario donde se detallan las diferentes zonas.....	11
Figura I.3. Desarrollo del tallo de tomate.....	12
Figura I.4. Desarrollo secundario del tallo de tomate	13
Figura I.5. Hoja de tomate compuesta e imparipinnada. Folíolos de tomate con diversa forma y tamaño.	14
Figura I.6. Sección de transversal de una hoja de tomate en la que se aprecia la anatomía interna	15
Figura I.7. Producción de tomate a nivel mundial	17
Figura I.8. (A) Producción nacional de tomate (millones de toneladas) y (B) rendimiento del cultivo (T/Ha) durante el periodo 2003-2013.....	19
Figura I.9. Producción del tomate en España y su superficie de cultivo.....	20
Figura I.10. Primeros cultivos hidropónicos de la historia.	26

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Morfología general de plantas de tomate.....	40
Figura 1.2. Cultivo hidropónico en cámara de altas prestaciones	41
Figura 1.3. Evolución diaria en temperatura —○—, humedad relativa —★— y radiación (PAR) —▲— en el interior de la cámara de cultivo de altas prestaciones	41
Figura 1.4. Consumo de agua acumulado registrado durante 5 semanas en 38 líneas RILs seleccionadas derivadas del cruce interespecífico entre <i>Solanum lycopersicum</i> (cv. Moneymaker, MM) y <i>Solanum pimpinellifolium</i> (ac. TO-937).	48
Figura 1.5. Altura de la planta registrada en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas.....	49

Figura 1.6. Diámetro del tallo registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en 38 líneas RILs seleccionadas	50
Figura 1.7. Número de hojas y superficie foliar total registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas....	51
Figura 1.8. Contenido de agua en hojas y en tallos registrados en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas....	53
Figura 1.9. Rendimiento del fotosistema II (Fv/Fm) registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas....	56
Figura 1.10. Contenido relativo de agua (CRA) foliar registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas....	57
Figura 1.11. Eficiencia transpiratoria (WUEi) registrado en dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas	58
Figura 1.12. Productividad del agua calculada en base al peso fresco (WP _{PF}) y al peso seco (WP _{PS}) de la parte aérea registrada en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas..	59
Figura 1.13. Relación entre productividad del agua calculada en base al peso fresco de la parte aérea de las plantas (WP _{PF}) y consumo de agua registrado durante 5 semanas consecutivas en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas	61
Figura 1.14. Análisis de componentes principales (ACP).....	64

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Modelo continuo suelo-planta-atmósfera donde se representa el flujo de agua como un flujo dinámico continuo a lo largo de los distintos compartimentos de la planta.....	74
Figura 2.2. Modelo compuesto del flujo radial de agua en el interior de la raíz.	78
Figura 2.3. Interior de las cámaras de cultivo utilizadas para el cultivo de las plantas.....	82

Figura 2.4. Estado de desarrollo de las plántulas de los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y de las 13 líneas RILs seleccionadas antes de la medida de Lpr (21 DDG).....	83
Figura 2.5. Medida de la tasa de flujo osmótico en un sistema radicular mediante la técnica de libre exudado en plantas de 21 días de edad	84
Figura 2.6. Evolución en el tiempo del volumen de savia producido por el exudado libre	85
Figura 2.7. Detalle del sistema usado para la recogida del exudado en plantas de 40 días de edad	88
Figura 2.8. Tasa de flujo de exudado libre, Q, gradiente de potencial osmótico, $\Delta\pi$; y conductancia hidráulica del sistema radicular, Lr obtenida en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a los 21 DDG.	90
Figura 2.9. Imágenes representativas del desarrollo de las raíces a 21 DDG, en los dos genotipos parentales <i>Solanum lycopersicum</i> (MM) y <i>Solanum pimpinellifolium</i> (TO-937) a 21 DDG y en las 13 líneas RILs derivadas de este cruce.	92
Figura 2.10. Parámetros biométricos de la raíz en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a los 21 DDG.	93
Figura 2.11. Conductividad hidráulica del sistema radicular (Lpr) calculado en base a la longitud, a la superficie y al peso seco de la raíz en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas, en plantas de 21 DDG.	96
Figura 2.12. Tasa de flujo de exudado libre, Q; gradiente de potencial osmótico, $\Delta\pi$; y conductancia hidráulica del sistema radicular (Lr) registrado en los genotipos parentales de la población RIL, en plantas de 40 DDG.	97
Figura 2.13. Imágenes representativas del estado de desarrollo de la raíz de MM y de TO-937 en plantas de 40 DDG. Parámetros biométricos de la raíz.....	98

Figura 2.14. Conductividad hidráulica del sistema radicular (Lpr) calculado en base a la longitud, a la superficie, y al peso seco de la raíz registrado en los genotipos parentales de la población RIL, en plantas de 40 DDG.	99
---	----

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Arquitectura del sistema radicular de tomate a los 14 días después de germinación	109
Figura 3.2. Sección transversal de una raíz de tomate en la que se detallan las diferentes capas celulares	110
Figura 3.3. Desarrollo de las plantas a los 4, 7, 11 y 14 DDG crecidas en cámara de cultivo tipo Fitotrón y medio hidropónico.....	114
Figura 3.4. Desarrollo de las plantas utilizadas para el estudio de la anatomía interna de la raíz	116
Figura 3.5. Secuencia de desarrollo del sistema radicular del parental doméstico MM.....	119
Figura 3.6. Ajuste de la dinámica de elongación del sistema radicular durante los 14 DDG.....	121
Figura 3.7. Tasas de elongación del sistema radicular en los dos genotipos parentales y en las 13 líneas RILs seleccionadas	122
Figura 3.8. Fenotipo de raíz de las 13 líneas RILs seleccionadas derivadas del cruce interespecífico entre <i>Solanum lycopersicum</i> (MM) x <i>Solanum pimpinellifolium</i> (TO-937) a 14 DDG.....	124
Figura 3.9. Distribución de la longitud correspondiente a las zonas de ramificación aparente y sin ramificación aparente de la raíz primaria en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a 14 DDG.	125
Figura 3.10. Raíces laterales en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a 14 DDG	126

Figura 3.11. Densidad de ramificación en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a 14 DDG.	127
Figura 3.12. Secciones transversales de raíces laterales en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en 6 líneas RILs seleccionadas	128
Figura 3.13. Secciones transversales de raíces laterales en 7 líneas RILs seleccionadas	129
Figura 3.13. Anatomía interna del cilindro vascular en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas	131

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Estructura molecular de las AQPs	144
Figura 4.2. Modelo de la estructura de SoPIP2;1 de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>).....	148
Figura 4.3. Conductividad hidráulica en raíces (Lpr) en respuesta al HgCl ₂ . A los 21 DDG se calculó la Lpr en base a la superficie de la raíz en los genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas con tres tratamientos diferentes: Lpr “control”, Lpr “HgCl ₂ ” y Lpr “HgCl ₂ +DTT”	163
Figura 4.4. Potencial osmótico del exudado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas tratadas y sin tratar con HgCl ₂ a los 21 DDG.	165
Figura 4.5. Árbol filogenético de las 47 AQPs identificadas en tomate	167
Figura 4.6. Ratio de la expresión normalizada entre raíz y hoja de los 14 genes PIP identificados en <i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Heinz 1706.....	168
Figura 4.7. Cantidad relativa de ARNm de 4 PIPs con respecto al gen de referencia (<i>SICAC</i> , Solyc08g006960) en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a los 21 DDG.....	169
Figura 4.8. Tinción con Auramina O en los dos genotipos parentales (MM y TO-937).....	172

Figura 4.9. Tinción con Auramina O en dos líneas RILs seleccionadas por sus diferencias en Lpr (RIL 65 y RIL 121)	173
Figura 4.10. Tinción con Fluorol Yellow 088 en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en dos líneas RILs seleccionadas por sus diferencias en Lpr (RIL 65 y RIL 121)	175
Figura 4.11. Tinción con Fluorol Yellow 088 que muestra una deposición de la suberina no continúa a lo largo de la longitud de la raíz. Secciones transversales en los genotipos parentales (MM y TO-937) y en dos líneas RIL seleccionadas (RIL 65 y RIL 121) pertenecientes a la misma planta.....	177

ÍNDICE DE TABLAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Tabla I.1. Clasificación de países por producción de tomate	18
--	----

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. Composición de la solución nutritiva tipo Hoagland y Arnon (1950) modificada para el cultivo de tomate	42
--	----

Tabla 1.2. Producción de biomasa registrada en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas	54
--	----

Tabla 1.3. Variables de intercambio gaseoso registradas al final del periodo de experimentación en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas.....	55
---	----

Tabla 1.4. Análisis de correlación de Pearson.....	63
---	----

Tabla 1.5. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos en el que la variable dependiente fue el consumo de agua.....	65
---	----

Tabla 1.6. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos en el que la variable dependiente fue WP_{PF}	65
---	----

Tabla 1.7. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) estimada para los parámetros morfológicos y fisiológicos en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas.....	66
---	----

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. Líneas RILs seleccionadas en base a los valores de WP_{PF} , obtenidos en el capítulo 1, para la determinación de Lpr	81
---	----

Tabla 2.2. Distribución de la longitud (m) y de la superficie (m^2) de raíz en tres categorías: raíces finas, raíces grosor medio y raíces gruesas. Los datos se obtuvieron de raíces de plántulas de 21 días de edad, correspondientes a los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y a las 13 líneas RILs seleccionadas.....	95
---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Longitud total de la raíz (cm) de 13 líneas RILs seleccionadas derivadas del cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (MM) x *Solanum pimpinellifolium* (TO-937), registrada a los 4, 7, 11 y 14 DDG..... 120

Tabla 3.2. Características anatómicas de raíces laterales registradas en cortes transversales efectuados a 15 mm del ápice en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas..... 130

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y qRT-PCR, identificando el gen amplificado y tamaño en pares de bases del amplicón obtenido usando ADNc como molde..... 160

RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El principal objetivo de este trabajo de tesis ha sido generar información sobre los parámetros involucrados en la eficiencia del uso del agua en el cultivo de tomate con idea de poder introducir este carácter en programas de mejora genética. Para ello se ha abordado el estudio, centrado principalmente en la raíz, de caracteres fisiológicos, anatómico-morfológicos y moleculares de una población RIL derivada del cruce interespecífico entre la especie de tomate doméstico *Solanum lycopersicum* y la especie de tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium*.

El cultivo de tomate bajo invernadero es, económicamente, una de las actividades agrícolas más importantes en el área mediterránea. Este cultivo presenta una problemática asociada al clima de esta zona que induce altas tasas de transpiración y estrés hídrico en las plantas, lo que conlleva grandes pérdidas de calidad y cosecha. Conocer en detalle qué caracteres de la raíz están implicados en la captura de agua, ayudaría a desarrollar un programa de mejora orientado a una mayor eficiencia en el uso del agua en este cultivo.

El estudio comenzó con la evaluación del consumo de agua y la producción de biomasa de 40 líneas de la población RIL, lo que permitió determinar la existencia de una alta variabilidad genética en ambos parámetros. La variabilidad existente en la producción de biomasa de la población RIL se manifestó en diversos parámetros como la superficie foliar, el diámetro del tallo o el peso seco de la raíces. Por otro lado, se observó una elevada variabilidad en la productividad del agua en términos de biomasa producida por volumen de agua consumida. Los análisis estadísticos llevados a cabo permitieron determinar que la variabilidad existente en la productividad del agua venía determinada, principalmente, por el diámetro del tallo, presentando este diámetro una alta correlación positiva con el contenido de agua en el mismo. Además, se encontró una alta variabilidad en transpiración de la planta entera, lo

que sugirió la existencia de diferencias en la capacidad de las raíces de absorber agua.

Para llevar a cabo las medidas de conductividad hidráulica de la raíz (Lpr), se puso a punto un método que permitió determinar este parámetro en plantas jóvenes, de 21 días de edad. La Lpr determinada en líneas RILs que difieren en el consumo de agua y en la producción de biomasa, presentó también una alta variabilidad, registrándose diferencias de más del 80% entre algunas de ellas. Se continuó el estudio explorando distintos caracteres que pudieran explicar esta variabilidad en la Lpr. En un principio se pensó que estas diferencias podrían relacionarse con diferencias tanto en la longitud o absorción de agua de las raíces como en la distribución de dichos parámetros en tres categorías de grosor (raíces finas, medias y gruesas). Sin embargo, las diferencias registradas en estos parámetros fueron insuficientes para poder explicar la gran variabilidad registrada en la Lpr.

La exploración de otros caracteres de la raíz que condicionan su arquitectura como pueden ser la tasa de elongación o el índice de ramificación y su anatomía interna como el grosor del córtex o el número y calibre de los vasos del xilema, entre otros parámetros, no permitieron observar correlaciones claras entre ellos y los valores de Lpr, a pesar de la gran variabilidad registrada en algunos de estos parámetros.

Con idea de determinar la posible contribución de las acuaporinas al transporte radial de agua en la raíz por vía transcelular, se llevaron a cabo experimentos con cloruro de mercurio, un inhibidor reversible de la actividad de estos canales. En las líneas RILs analizadas, los resultados mostraron una disminución en los valores de Lpr de entre un 42% y un 80%. Por otro lado, se analizó la expresión relativa de cuatro genes que codifican para acuaporinas específicas de la raíz de tomate. Se observaron diferencias significativas entre

los genotipos analizados aunque no se encontró una correlación directa entre dicha expresión y la Lpr.

La parte final de este trabajo consistió en llevar a cabo una exploración preliminar de la existencia de biopolímeros de barrera en ciertas zonas de la raíz, ya que podrían afectar al flujo radial del agua por la vía apoplástica y por tanto a los valores de Lpr. Se evaluó la deposición de suberina en los genotipos parentales y en dos líneas RILs cuyos valores de Lpr presentaban diferencias significativas. Se observó la ausencia de depósitos de suberina en la endodermis de las raíces y la existencia de una exodermis suberificada en los cuatro genotipos estudiados. Este estudio histológico preliminar establece una posible correlación entre los valores de Lpr y los depósitos de suberina en la exodermis, ya que los genotipos con mayores valores de Lpr fueron los que presentaron un mayor número de células de paso sin depósitos de suberina.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que existe una alta variabilidad en parámetros relacionados con la conductividad hidráulica de las raíces. No obstante, ninguno de estos parámetros permitiría explicar por sí solo la variabilidad registrada en la Lpr. La información generada ha permitido identificar algunos caracteres que presentan una mayor repercusión sobre la Lpr. Además, se han identificado genotipos contrastantes que constituyen un material muy útil en futuras investigaciones.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN GENERAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I.1. Arquitectura y morfología de la planta de tomate

El tomate es una planta dicotiledónea, autógama, de porte arbustivo y perenne, aunque generalmente se cultiva como anual (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta, creciendo de manera indeterminada (crecimiento ilimitado) o determinada (limitado). Las plantas de tomate con crecimiento indeterminado, carácter silvestre de la especie y de aquellos genotipos que se cultivan principalmente en invernadero para consumo fresco, presentan un desarrollo nodal continuo con aparición de las inflorescencias de manera internodal lateral cada 3 hojas. A la porción de tallo que incluye 3 o 4 hojas y un racimo se le denomina «simpodio» (Chamarro, 1995). Por el contrario, en las de crecimiento determinado, que se cultivan al aire libre principalmente como tomate de industria, el tallo principal soporta un número inferior de hojas y termina en una inflorescencia, por lo que el crecimiento de la planta ha de seguir por los tallos laterales o secundarios desarrollados a partir de las yemas axilares, dando lugar a una planta de poca altura y aspecto arbustivo (Rick, 1978).

La semilla de tomate es pequeña (~2-4 mm) y aplanada y está constituida por el embrión, el endospermo y la cubierta seminal, la cual se encuentra generalmente recubierta de pelos. Para su germinación es necesaria una buena disponibilidad de agua así como una oxigenación eficiente (Chamarro, 1995).

El sistema radicular de la planta de tomate es alorrido o pivotante y está constituido por la raíz principal o primaria (corta y débil), las raíces laterales (numerosas y potentes) y las raíces adventicias (Fig.I.1). La raíz primaria se desarrolla durante la embriogénesis y a partir de ella se producen las raíces laterales secundarias, que a su vez se pueden ramificar. Las raíces adventicias son aquellas que se desarrollan en el hipocótilo, epicótilo y/o tallo (Osmont *et al.*, 2007).

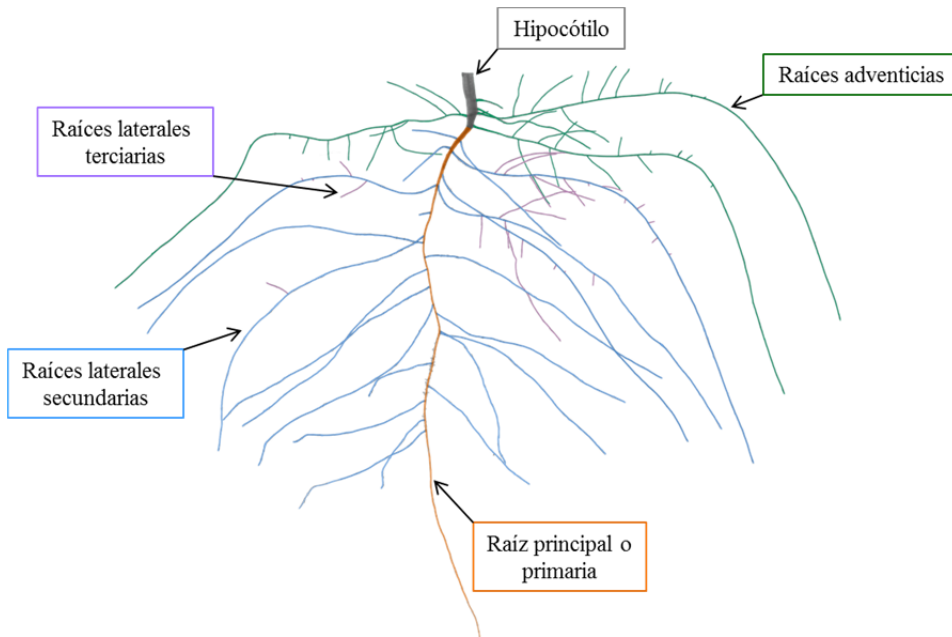


Figura I.1. Sistema radicular de la planta de tomate donde se detallan las distintas raíces que lo conforman.

La raíz de tomate presenta un crecimiento primario y secundario que determina el incremento de su diámetro, debido principalmente al desarrollo del cilindro vascular. Cuando la raíz presenta crecimiento primario, seccionando transversalmente y de fuera hacia dentro se pueden observar: la epidermis, la exodermis, el córtex, la endodermis y el cilindro vascular, jugando cada una de estas capas un papel diferente en la absorción de agua y nutrientes (Esau, 1967). La arquitectura, morfología y anatomía de la raíz se describirán con más detalle en la introducción del capítulo 3.

El crecimiento secundario de la raíz de tomate se inicia con divisiones periclinales del procambium vascular no diferenciado y de las células del periciclo opuestas al xilema. Estas divisiones producen una capa interna, considerada como el cambium vascular, que se encuentra rodeando al xilema y una capa externa que se mantiene como periciclo. El cambium vascular es una capa celular meristemática cuyas células pueden dividirse y diferenciarse en

células xilemáticas y floemáticas, aumentando el diámetro de la raíz y su capacidad de transporte (McCully, 1995; Rich y Watt, 2013). En la figura I.2 se muestra el aspecto que puede tener una raíz de tomate en crecimiento secundario que tras diversas divisiones celulares y diferenciación de las mismas, se observan las mismas capas celulares que en el crecimiento primario con la principal diferencia de que los vasos xilemáticos presentan un mayor diámetro y no presentan una disposición de los mismos en estructuras poliarcas.

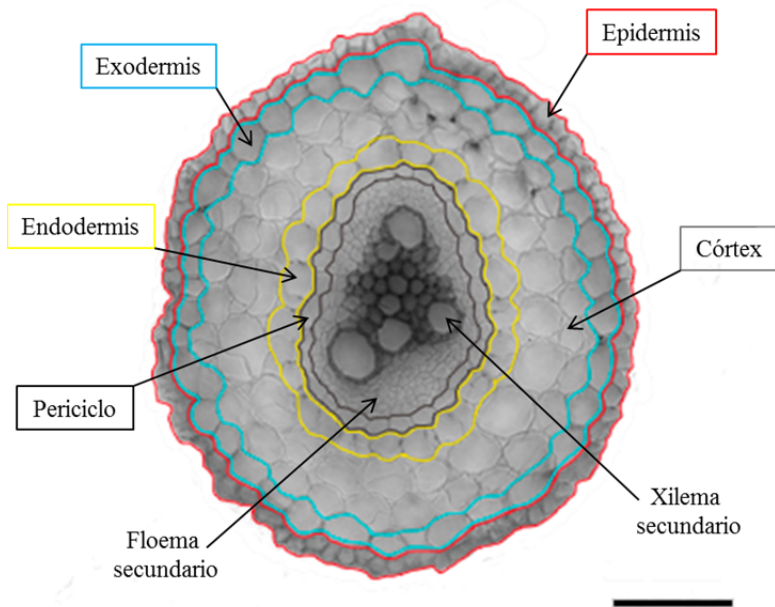


Figura I.2. Sección transversal de una raíz de tomate con crecimiento secundario donde se detallan las diferentes zonas. Corte realizado a mano alzada (~0,3 mm de grosor) en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz primaria y posterior visualización con un microscopio confocal con luz transmitida. Barra equivale a 100 μm .

El tallo, en la parte apical de la planta de tomate, presenta sólo crecimiento primario y está constituido por la epidermis, el córtex, los tejidos vasculares y la médula (Fig.I.3A). La epidermis constituye la capa celular más externa, donde se desarrollan los tricomas glandulares y no glandulares. Debajo de la epidermis se localiza el córtex, cuyas células más externas presentan función fotosintética, mientras que las más internas son de tipo colenquimático y tienen una función

estructural (Picken *et al.*, 1986). Los haces vasculares, formados por el xilema primario, el floema primario y el procambium, presentan una disposición circular que encierra una médula de parénquima, lo que se conoce con el nombre de sifonostela (Rost, 1996; Ye, 2002).

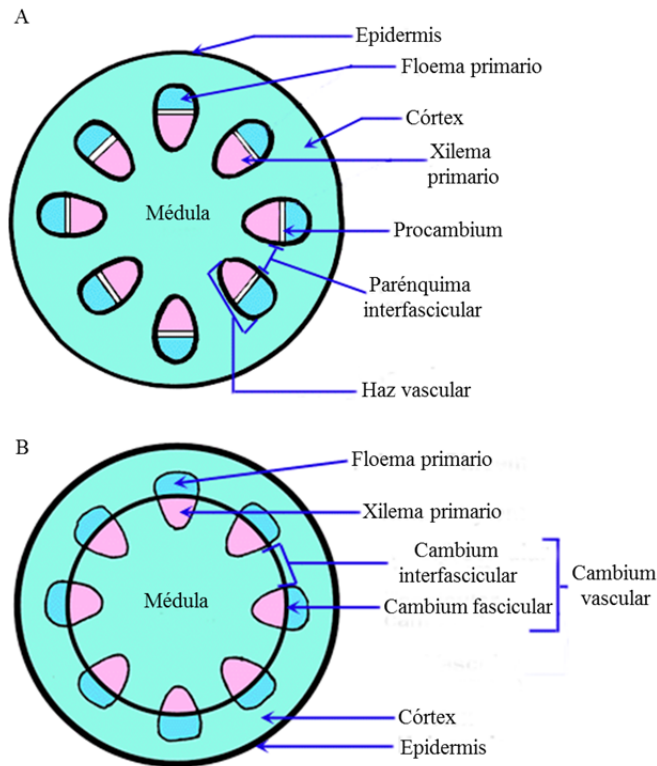


Figura 1.3. Desarrollo del tallo de tomate. (A) Esquema de una sección transversal de tallo de tomate con crecimiento primario donde se detallan las diferentes zonas. (B) Formación del cambium vascular que marca el inicio del crecimiento secundario. Esquema tomado de Rost (1996).

El crecimiento secundario del tallo comienza con la formación del cambium vascular, un tejido meristemático formado por el cambium fascicular (derivado del procambium) y del cambium interfascicular (derivado de la dediferenciación del parénquima interfascicular) (Esau, 1967). Este tejido meristemático completamente desarrollado forma un cilindro continuo desde dónde se formará el xilema secundario (hacia el interior) y el floema secundario

(hacia el exterior) (Fig.I.3B). De esta manera, los tejidos vasculares primarios van alejándose entre ellos hasta localizarse el floema primario cercano al córtex y el xilema primario cercano a la médula (Fig.I.4A) (Thompson y Heimsch, 1964; Rost, 1996). Tras la actividad del cambium vascular, que produce el crecimiento en grosor de los tallos, el tallo del tomate puede presentar una morfología angulosa (Fig.I.4B) (Coaker *et al.*, 2002) debido a diferencias en el desarrollo de los distintos tipos de tejido vascular y parenquimático.

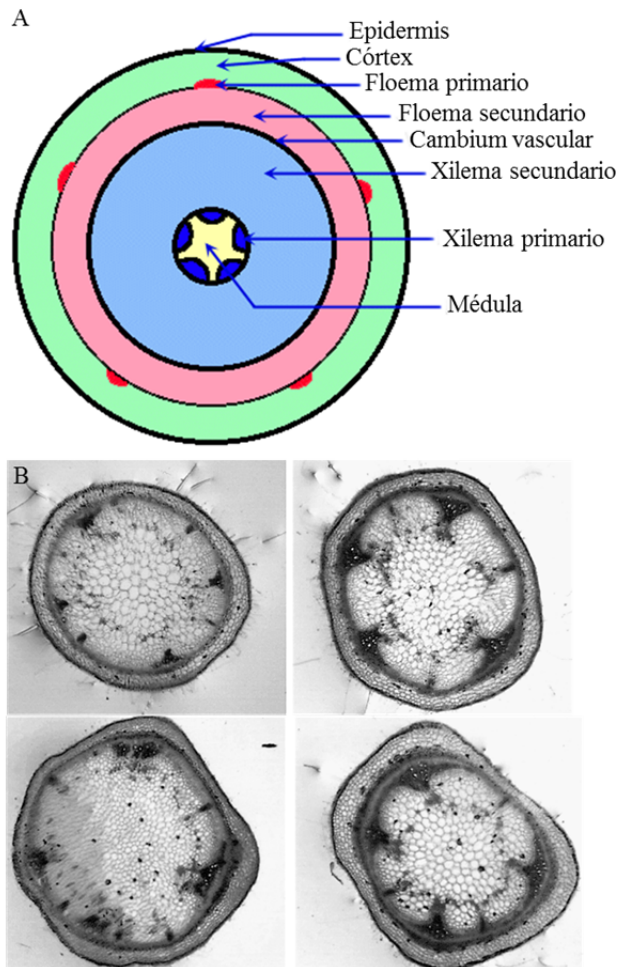


Figura I.4. Desarrollo secundario del tallo de tomate. (A) Esquema de una sección transversal de tallo de tomate con crecimiento secundario donde se detallan las diferentes zonas. Esquema tomado de Rost (1996). (B) Secciones transversales de distintos genotipos de tomate donde se observa la morfología del mismo Coaker *et al.* (2002).

Las hojas del tomate, dispuestas de forma alterna sobre el tallo, son de tipo compuesto e imparipinnado, con peciolo de 1,5-6 cm y con foliolos que miden de 4-60 por 3-40 mm (Fig.I.5A). Una hoja típica presenta foliolos, generalmente de 5 a 9, peciolados, lobulados, muy desiguales, alternos y pudiendo tener el borde dentado (Fig.I.5B), y se encuentran recubiertos de tricomas. En la base del raquis de la hoja o del peciolo puede haber un par de brácteas semejantes a estípulas o pseudoestípulas.

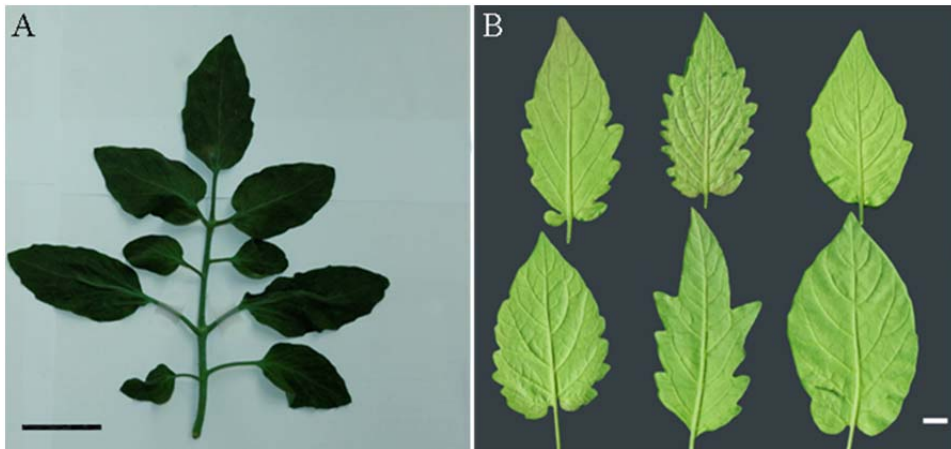


Figura I.5. (A) Hoja de tomate compuesta e imparipinnada (B) Foliolos de tomate con diversa forma y tamaño. Barra de (A) equivale a 5cm y la de (B) a 1 cm.

En la anatomía interna (Fig.I.6) encontramos el mesófilo (en empalizada y esponjoso) con un gran número de cloroplastos, recubierto por una epidermis abaxial y otra adaxial, cada una constituida por una única capa celular. Las células epidérmicas están recubiertas por una membrana de composición fundamentalmente lipídica, la cutícula, que actúa como una barrera frente al ataque de agentes externos (patógenos, radiación UV, contaminantes...) y como reguladora frente a las pérdidas de agua no estomáticas (Riederer y Schreiber, 2001). La epidermis abaxial presenta un alto número de estomas y haces vasculares prominentes, con un nervio central bien definido (Fig.I.5B) (Coleman y Greyson, 1976).

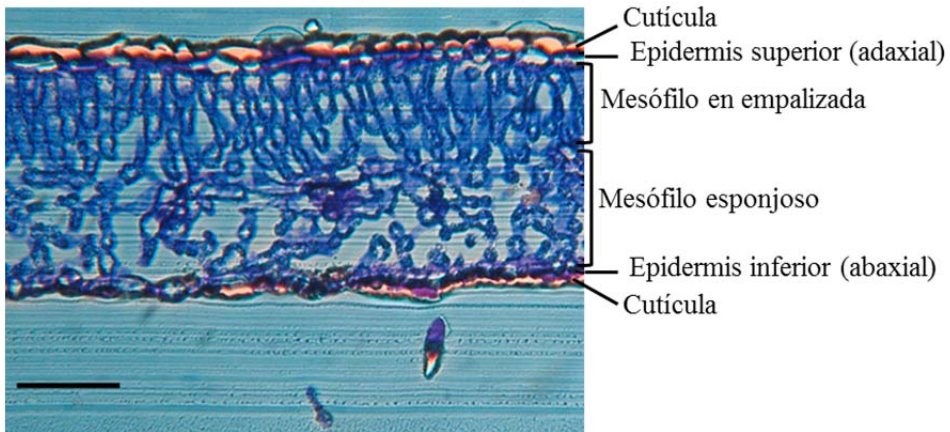


Figura I.6. Sección de transversal de una hoja de tomate en la que se aprecia la anatomía interna. Barra equivale a 100 μm .

La flor es de color amarillo intenso, regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos y de igual número de pétalos y estambres, los cuales suelen estar soldados entre sí formando un cono estaminal que envuelve al gineceo (estigma, estilo y ovario). Las flores, en número variable, se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso, que se desarrollan cada 3-4 hojas en las axilas, pudiendo existir al mismo tiempo pequeños frutos, flores abiertas y yemas florales cerradas (Cooper, 1927), en una misma inflorescencia.

El fruto de tomate es una baya bi- o plurilocular que puede alcanzar un peso final en la madurez que oscila entre los 5 y los 500 g, en función de la variedad y las condiciones de desarrollo. Está constituido por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas. La capa más externa del pericarpo constituye la epidermis, la cual carece de estomas y se encuentra recubierta por la cutícula (Rančić *et al.*, 2010). A medida que el fruto va madurando (Fig.I.9) se producen una serie de procesos que conducen a un aumento del contenido en azúcares, una disminución de la acidez, pérdida de firmeza e incremento de los aromas por la producción de sustancias volátiles (Escobar *et al.*, 2012).

I.2. Taxonomía, origen y domesticación del tomate

El nombre científico de uso más generalizado para el tomate doméstico en la actualidad es *Solanum lycopersicum* L. El género *Solanum* es el más grande de la familia *Solanaceae*, formada por 90 géneros que incluyen unas 3.500 especies, entre ellas algunas también de gran interés agronómico como la patata (*Solanum tuberosum*), el pimiento (*Capsicum annuum*), la berenjena (*Solanum melongena*) o el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Bergougnoux, 2014).

El origen geográfico del tomate se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile, incluyendo las islas Galápagos (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Darwin *et al.*, 2003). No está claro en qué región tuvo lugar su domesticación aunque basándose en pruebas botánicas, históricas y lingüísticas, De Candolle (1885) estableció este centro de domesticación en Perú, mientras que Jenkins (1948) propuso México. La falta de pruebas que permitan dilucidar entre las dos hipótesis sugiere que la domesticación del tomate pudo tener lugar de manera independiente tanto en México como en Perú (Rick y Holle, 1990; Peralta y Spooner, 2006). Posteriormente (en el siglo XVI) los españoles trajeron el tomate a Europa y desde aquí lo difundieron hacia Portugal, África, Oriente Medio y otros países europeos (Esquinas-Alcázar, 1981). Desde Portugal el tomate se extendió hacia Filipinas y demás países asiáticos mientras que desde el resto de Europa se propagó hacia Estados Unidos.

La domesticación ha permitido llevar a cabo una selección artificial a favor de características deseadas (tamaño, color, sabor, maduración del fruto...). Sin embargo, dicha domesticación lleva consigo una pérdida de diversidad genética (Bai y Lindhout, 2007; Foolad, 2007) lo que hace al cultivo más susceptible frente a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos, y puede suponer la pérdida de gran parte de las características que tenían las variedades ancestrales. Con idea de recuperar parte de la variabilidad perdida en el proceso

de domesticación se utilizan especies silvestres, que mantienen todo su potencial genético intacto, para introducir genes en la especie cultivada que ayuden a recuperar los caracteres perdidos. Para ello, una herramienta clave son las poblaciones de líneas puras recombinantes o RILs (del inglés, *Recombinant Inbred Lines*), obtenidas a partir del cruce de dos líneas puras seguido de repetidas secuencias de autofecundación para crear líneas consanguíneas cuyo genoma es un mosaico de los genomas de las cepas iniciales (Broman, 2005).

I.3. Importancia económica del cultivo de tomate

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo con 4,7 millones de hectáreas dedicadas y una producción que alcanza un valor de 142.968 millones de euros (FAOSTAT, 2013; Bergougnoux, 2014). Durante el periodo 2003-2013 se produjo un aumento de la producción mundial debido principalmente al incremento en el rendimiento. La producción de tomate pasó de ~120 millones de toneladas en 2003 a más de 160 en 2013, lo que supuso un incremento del ~30%. Sin embargo, la superficie mundial de cultivo creció a un menor ritmo, pasando de 4,1 Ha en 2003 a 4,7 Ha en 2013, lo que supuso un incremento aproximado del 13% en 10 años (FAOSTAT, 2012) (Fig.I.7A).

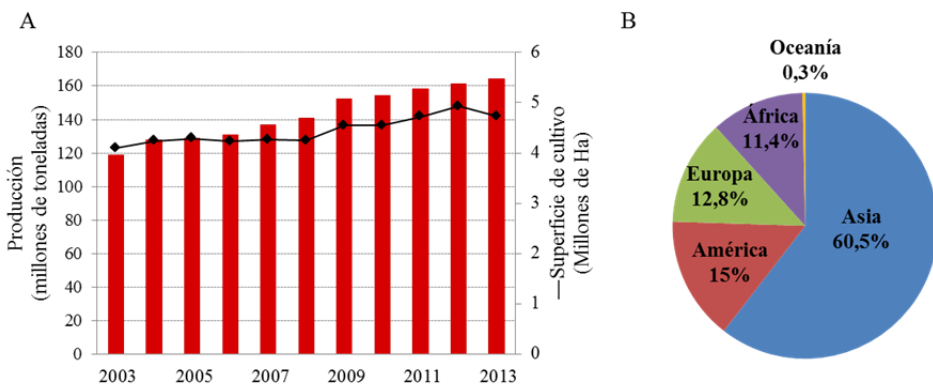


Figura I.7. Producción de tomate a nivel mundial. (A) Producción y superficie cultivada a lo largo del periodo 2003-2013. (B) Producción en el año 2013 por continente. (FAOSTAT, 2013).

Por continentes, el cultivo de tomate se concentra en Asia donde tiene lugar el 60,5% de la producción (Fig.I.7B). China encabeza dicha producción con más de 50 millones de toneladas obtenidas en 2012, lo que representa el 31% de la producción mundial (Tabla I). El segundo lugar lo ocupa India con 17,5 millones de toneladas (11% del total), seguida de Estados Unidos con 13,2 millones de toneladas (8,2%). España ocupa la octava posición con una producción de 4 millones de toneladas que corresponden a un 2,5% de la producción mundial de tomate para consumo fresco (Tabla I).

Tabla I.1 Clasificación de países por producción de tomate (FAOSTAT, 2012). * Datos no disponibles.

Posición	País	Producción (Millones de Toneladas)	Valor (millones de euros)
1	China	50,12	2.330.000
2	India	17,5	*
3	Estados Unidos	13,21	8.362
4	Turquía	11,35	4.631
5	Egipto	8,63	*
6	Irán	6	1.596
7	Italia	5,13	4.361
8	España	4,01	2.550
9	Brasil	3,87	2.910
10	México	3,43	1.108

I.3.1. Producción en España

La producción de tomate en España en el periodo 2003-2013, presentó pequeñas fluctuaciones alrededor de los 4 millones de toneladas de producción al año (Fig.I.8A) alcanzando un valor de 2.550 millones de euros (FAOSTAT, 2013). Durante este periodo de tiempo, el rendimiento del cultivo se incrementó un 24% llegando a las 82 toneladas por hectárea en 2013 (Fig.I.8B).

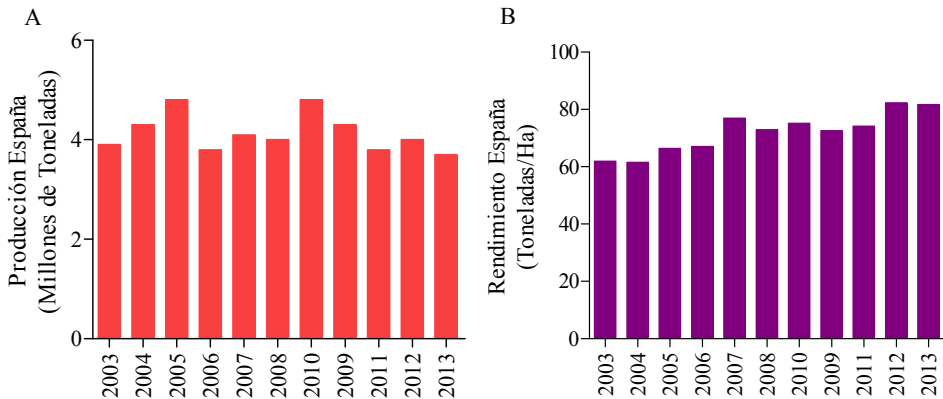


Figura 1.8. (A) Producción nacional de tomate (millones de toneladas) y (B) rendimiento del cultivo (T/Ha) durante el periodo 2003-2013. (FAOSTAT, 2013).

Cuando se escribió esta introducción, los datos disponibles en el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) correspondientes al año 2012, muestran que Andalucía y Extremadura lideraron la producción de tomates a nivel nacional con 1,6 y 1,4 millones de toneladas respectivamente, lo que supuso el 75% de la producción nacional total (Fig.1.9A). Las comunidades restantes, produjeron el otro 25%, destacando Murcia con un 7% (289.355 toneladas), Navarra con un 4% (147.889 toneladas) o Canarias con un 3% (126.171 toneladas). En ese mismo año, la superficie de cultivo de tomate alcanzó las 48.617 Ha, de las cuales un 61% correspondieron a cultivos al aire libre, un 38% a cultivos bajo invernadero y sólo 1% a cultivo de secano (Fig.1.9B). Andalucía destinó el 89% de su superficie de cultivo de tomate a la modalidad bajo invernadero registrándose una superficie de 13.047 Ha, mientras que en Extremadura el 100% de superficie destinada al cultivo de tomate fue al aire libre, con una superficie de 17.190 Ha. Estos datos ponen de manifiesto que el cultivo de tomate bajo invernadero se localiza principalmente en Andalucía dónde destacan Almería con una producción de 925.743 toneladas en 9.013 Ha, seguido de Granada con 314.910 toneladas en 3.172 Ha y Málaga con 54.362 toneladas en 770 Ha.

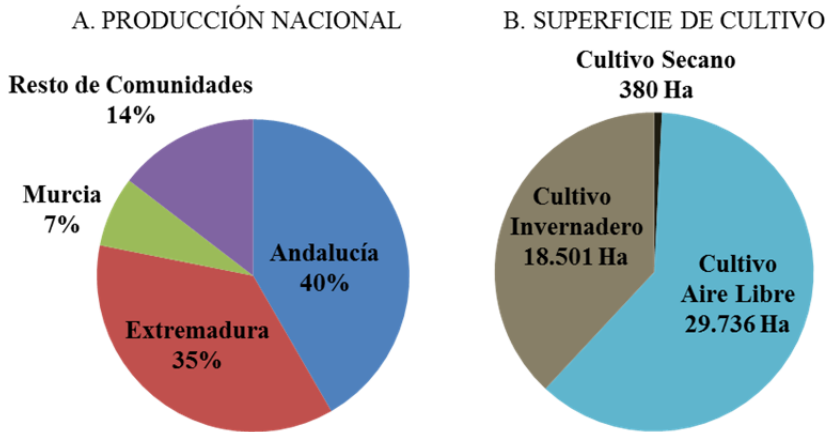


Figura 1.9. Producción de tomate en España y su superficie de cultivo. (A) Producción nacional de tomate (%) por comunidades autónomas. (B) Superficie de cultivo (Ha) dedicada a los distintos tipos de cultivo (MAGRAMA, 2012).

A nivel mundial, España ocupa el tercer puesto en las exportaciones de tomate fresco, tras los Países Bajos y México, alcanzando un valor de 983 millones de euros (Hortoinfo, 2013), lo que supuso el 27% de la producción nacional (999.000 toneladas). El 94% de los tomates que exportó España en 2013 tuvo como destino países comunitarios. Alemania, Francia o Reino Unido importaron 517.000 toneladas, significando un ingreso total de 506 millones de euros. Andalucía fue la región que presentó una mayor exportación con un 65% del total (624.000 toneladas), destacando Almería con unas exportaciones de 550.000 toneladas que supusieron 512 millones de euros (Hortoinfo, 2013).

En relación al destino de la producción de tomate, la mayor parte se emplea en consumo fresco (60%), mientras que el 40% restante va dirigido a la industria para obtener tomate triturado, concentrado, sopas, etc. El tomate dirigido a la industria es cultivado normalmente en período estival y al aire libre. Extremadura es la comunidad autónoma que encabeza la producción de este tipo de tomate con 1,4 millones de toneladas (casi el 100% de su producción), seguida de Andalucía donde este sector está cobrando cada vez más importancia gracias principalmente a la producción localizada en Sevilla. El tomate destinado

a consumo fresco se cultiva mayoritariamente de manera intensiva y bajo invernadero y su producción se concentra en el levante almeriense.

I.4. Problemática del cultivo de tomate bajo invernadero en el área mediterránea

Existen diferentes factores que pueden afectar a la rentabilidad económica de los cultivos de invernadero en el área mediterránea, entre ellos el estrés hídrico ambiental (Romero-Aranda *et al.*, 2002; Chaves y Oliveira, 2004; Jurado *et al.*, 2009), la estacionalidad de la producción, la disponibilidad de agua para el riego (Aguilera, 2006) o el incremento de la salinidad en los suelos de cultivo (Cruz *et al.*, 1990; Caro *et al.*, 1991; Romero-Aranda *et al.*, 2001; Romero-Aranda *et al.*, 2002).

I.4.1. Estrés hídrico ambiental

A pesar de que en el cultivo de tomate bajo invernadero el riego suele suministrarse en exceso, las plantas sufren de forma periódica intensos episodios de estrés hídrico ambiental en las horas centrales del día (Romero-Aranda *et al.*, 2002). Esto se debe a las características del clima mediterráneo que determinan en el interior de los invernaderos altas temperaturas y baja humedad relativa, incluso en días soleados de invierno, lo cual induce elevadas tasas de transpiración foliar (Romero-Aranda *et al.*, 2001; Romero-Aranda *et al.*, 2002). Esta intensa transpiración foliar, produce un desequilibrio en tiempo e intensidad, entre la cantidad de agua que las raíces son capaces de absorber y transportar a la parte aérea y la cantidad de agua que pierden las hojas por transpiración. Dicho desequilibrio entre los flujos de entrada y salida de agua en la planta produce un descenso del potencial hídrico foliar que conlleva el cierre estomático y la disminución de la tasa de fotosíntesis. Además, este descenso del potencial hídrico foliar cuando la planta está en fase de fructificación, puede inducir un reflujo de agua desde los frutos hacia las hojas, lo que ocasiona una

reducción del tamaño de los mismos y que se traduce en una pérdida de cosecha (Guichard *et al.*, 2005). Por otro lado, esta situación puede generar fallos en la fase reproductiva provocando un menor cuajado de frutos (Chaves *et al.*, 2002) y el desarrollo de fisiopatías que afectan a la calidad de la cosecha, como la aparición de la podredumbre apical en los frutos (Saure, 2001).

I.4.2. Estacionalidad y duración de los periodos de producción

La estacionalidad de la producción y la duración de los periodos de cosecha son aspectos que determinan la rentabilidad del cultivo bajo invernadero en el área mediterránea. Las características del clima mediterráneo, favorece la producción del cultivo de tomate en primavera, verano y otoño en comparación con el cultivo de invierno (Aldanondo, 1995). Sin embargo, la radiación solar que se alcanza durante los meses de primavera y verano puede producir dentro del invernadero, condiciones térmicas estresantes y atmósferas de alta demanda evaporativa que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas. Como solución se han desarrollado distintas técnicas de climatización (sistemas de sombreado, nebulización o aspersión) que disminuyen los excesos térmicos y el déficit hídrico ambiental (Arbel *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 2003). La implantación en los invernaderos de estos sistemas de climatización permite alargar el calendario de producción, permitiendo cultivar de forma intensiva durante todo el año, lo que conlleva un aumento de la rentabilidad económica del sistema.

La producción intensiva bajo invernadero ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar genotipos altamente productivos durante un mayor periodo de tiempo. En este sentido ha sido determinante el desarrollo de portainjertos, una técnica cultural que combina en una misma planta la parte aérea de un genotipo (injerto), que puede incrementar el vigor de la planta o la calidad del fruto (Flores *et al.*, 2010), con la raíz de otro diferente (porta-injerto) que puede ofrecer además de resistencia a ciertos patógenos de suelo, una alta

capacidad de absorción de agua y nutrientes (Lee, 1994; Leonardi y Giuffrida, 2006).

I.4.3. Escasez de los recursos hídricos y salinidad

Las predicciones de cambio climático para los países mediterráneos proyectan una disminución sustancial de los recursos hídricos disponibles, con un aumento en las próximas décadas del estrés hídrico en las tierras de cultivo del sur de Europa (IPCC 2008). Si no se generan recursos hídricos no convencionales (agua regenerada procedente de depuradoras o de los lixiviados de cultivos, agua de mar desalinizada, etc), en el área mediterránea el escenario de escasez de agua a medio y largo plazo se verá fuertemente intensificado. Además, en esta zona, la agricultura debe afrontar el reto de abastecer la creciente demanda de alimentos como resultado de las tasas de crecimiento de la población (Schneider *et al.*, 2011). En el área mediterránea la actividad agrícola actual consume entre el 60 y el 90% del agua dulce disponible, llegando al 87% en el sureste de España (Grindlay *et al.*, 2011). Con este escenario es evidente la necesidad de potenciar programas de mejora que aumenten la eficiencia de uso del agua en los cultivos.

La horticultura intensiva bajo invernadero destaca por sus altos valores de producción y por la calidad de las cosechas. Sin embargo, a pesar de que este tipo de agricultura es capaz de reducir en un 70% el consumo de agua con respecto al cultivo al aire libre (Tognoni, 2003), los requerimientos de riego siguen siendo muy elevados. En el caso del cultivo de tomate en estas condiciones en el litoral mediterráneo andaluz, se requiere unos 40-45 litros para producir un Kg de cosecha (Reina-Sanchez *et al.*, 2005).

Gran parte de los programas de mejora que se han abordado en el cultivo de tomate en los últimos 50 años se han centrado en el tamaño del fruto y en la resistencia a plagas y enfermedades. Estos programas se han desarrollado en situaciones de alto aporte de fertilizantes y riego, de manera que la mayoría de

los genotipos de tomate de élite que ahora están siendo cultivados tienen poca adaptación a la sequía.

Por todo lo anteriormente mencionado, el uso eficiente de agua (WUE, del inglés *Water Use Efficiency*) es un aspecto en el que hay que incidir de una manera ineludible para desarrollar una agricultura sostenible que permita mantener niveles altos de productividad y calidad de las cosechas. Para ello es necesario avanzar en el conocimiento de la planta en cuanto a la captación y utilización del agua de riego, con el fin de obtener sistemas radicales que permitan un alto aprovechamiento de los recursos hídricos reduciendo a la vez las pérdidas por lixiviados. La identificación de genotipos con sistemas radicales altamente eficientes en la captura de agua, permitiría su uso como portainjertos de variedades de interés comercial. El uso de portainjertos eficientes en la captura de agua permitiría mantener una alta producción con las características organolépticas y nutricionales que los mercados actuales demandan.

En el sudeste español, la salinidad es uno de los problemas más importantes con los que actualmente se enfrenta la horticultura intensiva bajo invernadero. En estas zonas, la escasez de agua de lluvia y la alta demanda de agua que requieren los cultivos intensivos bajo invernadero está provocando una explotación excesiva de los acuíferos subterráneos. Esto está dando lugar a un aumento en la concentración de sales disueltas en el agua disponible para el riego, de manera que actualmente es frecuente encontrar en los pozos aguas con concentraciones de NaCl de entre 35 y 70 mM (Urdanoz *et al.*, 2008).

La salinización de los suelos puede tener un origen natural, por exposición a periodos prolongados de sequía o bajas tasas de precipitación (Flores-Díaz *et al.*, 1996), o por el contrario ser inducida por el hombre a causa del riego con aguas salinas y/o el abuso de fertilizantes. En ambos casos el resultado es el mismo, la

aparición de suelos no aptos para el cultivo (Alberto *et al.*, 1983; McFarlane y Williamson, 2002).

Las plantas de tomate cultivadas en suelos salinos o con aguas salinas sufren alteraciones en todo su metabolismo, produciendo diferentes efectos según el estado de desarrollo de las mismas (Cuartero *et al.*, 1995). Sin embargo, desde el punto de vista estrictamente agronómico, la principal consideración a tener en cuenta es cómo afecta a la cosecha (Mittler y Blumwald, 2010). Por un lado, el número de frutos producidos suele disminuir debido a la reducción en el número de flores aparecidas y/o a la reducción en el cuajado de esas flores (Cruz *et al.*, 1990). Por otro lado, la salinidad también puede provocar una disminución del tamaño del fruto así como una notable merma en la calidad del mismo por la aparición de fisiopatías como la podredumbre apical (Romero-Aranda *et al.*, 2001; Romero-Aranda *et al.*, 2002; Reina-Sanchez *et al.*, 2005).

Para combatir los efectos del estrés salino es necesario combinar diversas estrategias como la obtención de variedades de tomate tolerantes a la salinidad, el uso de injertos o incrementando la humedad relativa alrededor de las plantas (An *et al.*, 2005; Cuartero *et al.*, 2006). Además de estas estrategias, el uso de cultivo sin suelo o hidropónico puede considerarse también una alternativa muy útil para combatir el incremento de la salinidad en los suelos.

I.5. Cultivo hidropónico como estrategia frente a la escasez de agua

El cultivo hidropónico permite una mejor gestión del riego además de presentar la posibilidad de recogida de los drenajes para su posterior reciclado. La salinidad del suelo unido a la escasez de agua en zonas con una alta densidad de cultivos bajo invernadero, son factores que han propiciado la sustitución gradual del cultivo tradicional en suelo por el cultivo hidropónico en diferentes tipos de sustrato artificial. De este modo, en la zona costera del sureste español, concretamente en Almería, se está registrando un continuo aumento en la

superficie dedicada a este tipo de cultivo, alcanzando unas 5.500 Ha de superficie dedicada a los cultivos hidropónicos (Urrestarazu, 2011).

La hidroponía presenta una larga trayectoria ya que civilizaciones antiguas recurrieron a esta técnica cultural como medio de subsistencia en la que un sustrato (arenas de río) se humedecía con agua y materia orgánica en descomposición. Ejemplos de estos primeros cultivos hidropónicos los tenemos en los Jardines colgantes de Babilonia o los Jardines flotantes Aztecas (Fig.I.10). Las soluciones hidropónicas actuales se desarrollaron a partir del siglo XVII cuando diversos autores como van Helmont y Woodward, empezaron a entender que las plantas estaban compuestas por constituyentes que procedían del agua y no únicamente del suelo. Más de cien años después, Sachs y Knop consiguieron cultivar plantas terrestres en soluciones minerales y finalmente en 1936, Gericke acuñó el término hidroponía demostrando la aplicabilidad de este medio de cultivo tras realizar el primer cultivo comercial precisamente de tomate (Stradiot, 2003).

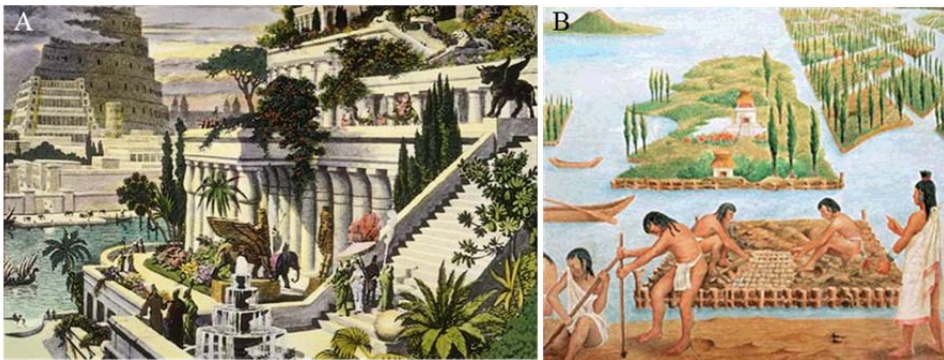


Figura I.10. Primeros cultivos hidropónicos de la historia. (A) Jardines colgantes de Babilonia (pintura de Martin Heemskerck). (B) Jardines flotantes de los Aztecas (fotografía tomada de Arano (2007)).

Desde un punto de vista práctico, los sistemas hidropónicos pueden clasificarse en: cultivo semi-hidropónico, en los que encontramos un sustrato inerte (lana de roca, fibra de coco, arena silíceo o vermiculita); y cultivo

hidropónico puro en el que la planta sumerge las raíces directamente en una solución con los distintos nutrientes necesarios, sin ningún tipo de soporte adicional. Inicialmente, la mayoría de los cultivos hidropónicos funcionaban como sistemas abiertos, en los que no existía una recirculación del riego y dónde la capacidad de retención de agua en los sustratos inertes era baja. El gran impacto medioambiental por posible contaminación de fuentes de agua dulce así como la necesidad de optimizar el uso del agua determinó el desarrollo de sistemas hidropónicos cerrados, en los que se produce una recirculación de las soluciones nutritivas (Stanghellini y Rasmussen, 1994).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El agua consumida es un parámetro clave en la productividad del cultivo de tomate, cuyo índice de cosecha está directamente relacionado con el peso fresco de los frutos, los cuales tienen un contenido de agua superior al 95%.

En la planta de tomate, el contenido de agua (agua retenida) puede calcularse como la diferencia entre el volumen de agua absorbido por el sistema radicular y el transpirado por la parte aérea. Los frutos no tienen estomas por lo que, si se desprecia la transpiración a través de la cutícula, pueden considerarse como órganos de almacenamiento de agua. En este sentido, una planta con alta capacidad para absorber agua podría abastecer de manera adecuada la demanda hídrica de la parte aérea y por tanto favorecer el suministro a los frutos. Podría afirmarse por tanto que la productividad del cultivo de tomate está relacionada en gran medida con la capacidad del sistema radicular para absorber agua.

Este hecho fue observado en una población RIL que se desarrolló en el Departamento de Mejora Genética y Biotecnología del IHSM. Por una parte, plantas bien regadas presentaron síntomas de deshidratación foliar al mediodía, mientras que por otra parte, había plantas que presentaban diferencias de gutación foliar y de encharcamiento en el envés de las hojas en las primeras horas de la mañana. Además, la población RIL presentó una variabilidad clara en cuanto a rasgos relacionados con el uso del agua, como el tamaño de las hojas, el grosor del tallo o la transpiración foliar, y se pensó que esta variabilidad podría estar sustentada, al menos en parte, por una variabilidad equivalente en el desarrollo y fisiología del sistema radicular.

En este punto, se planteó usar esta población para generar información útil sobre parámetros clave en la captura de agua por parte de las raíces y sobre su heredabilidad, lo cual podría hacerlos adecuados para su introducción en un programa de mejora de la eficiencia del uso del agua en tomate.

Así, el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue conocer el comportamiento de la población RIL desde el punto de vista de la productividad

en términos de consumo de agua. Posteriormente, el estudio se centraría en determinar la capacidad de absorción de las raíces y qué parámetros determinarían dicha capacidad.

Este objetivo general se dividió en los siguientes objetivos parciales:

- 1- Determinar si la población RIL estudiada presentaba variabilidad en cuanto al consumo de agua y la producción de biomasa.
- 2- Poner a punto un método para poder medir la conductividad hidráulica en raíces jóvenes de tomate. Dicho método se usaría para determinar la variabilidad en dicho parámetro entre las distintas RILs y sus parentales.
- 3- Estudiar la arquitectura y anatomía interna de la raíz de una serie de líneas RILs seleccionadas en base a su variabilidad en la productividad de agua.
- 4- Estudiar la expresión de genes que codifican para proteínas transportadoras de agua (acuaporinas) y analizar de forma preliminar la deposición de biopolímeros de barrera en las RILs seleccionadas.

CAPÍTULO 1

VARIABILIDAD EN EL CONSUMO DE AGUA Y PRODUCTIVIDAD DEL AGUA EN UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS PURAS RECOMBINANTES DE TOMATE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.1 Introducción

Uno de los principales puntos en los que se basa la sostenibilidad agrícola es la economía del agua, por lo que generar conocimiento que permita mejorar la eficiencia del uso del agua (WUE, del inglés *Water Use Efficiency*) es crítico para desarrollar una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente, que permita además producir los alimentos necesarios para abastecer las necesidades de una población en constante crecimiento (Alcamo *et al.*, 2007; Chapagain y Hoekstra, 2008).

En las últimas décadas se han desarrollado numerosas investigaciones sobre la mejora de la productividad del agua (WP, del inglés *Water Productivity*) en diversos cultivos, aunque el éxito de estos trabajos ha sido limitado. La principal causa de ello ha sido la falta de consideración de vinculaciones realistas entre las situaciones de estrés impuestas en estos estudios y la fisiología de la planta en una situación real de cultivo (Wuyts *et al.*, 2015). Por ello, cada vez son más numerosas las manifestaciones acerca de la necesidad de estudios que aborden una visión integradora del desarrollo de las plantas y que tengan como objetivo el incremento de la producción antes que priorizar aspectos relacionados con la supervivencia de la planta en condiciones de estrés (Nelissen *et al.*, 2014). Esto hace necesario conocer para cada cultivo los mecanismos en raíz y parte aérea que subyacen a la WUE y a la WP. En el caso del cultivo de tomate, esta información permitiría el desarrollo de nuevas variedades, adaptadas a escenarios específicos de cultivo en los que el estado hídrico del ambiente (suelo y atmósfera) puede variar de forma muy significativa, repercutiendo tanto en la captación de agua a nivel radicular como en las pérdidas por transpiración foliar.

Los términos WUE y WP generan gran confusión debido principalmente a las diferencias de significado que tienen en agronomía y en fisiología. Desde un punto de vista agronómico la WUE (WUEa) es la capacidad que tienen las

plantas para tomar de un modo efectivo el agua de riego aplicada (Perry *et al.*, 2009; Heydari, 2014), y se expresa como:

$$WUEa = \frac{\text{Agua consumida por la planta}}{\text{Agua total aplicada}} \quad (1)$$

Puesto que tanto el numerador como el denominador presentan las mismas unidades, WUEa es un parámetro adimensional. En los cultivos hidropónicos, donde las raíces no sufren una limitación por la disponibilidad de agua, la WUEa depende únicamente de la capacidad de las raíces para capturar e incorporar el agua dentro de la planta. En el presente trabajo, el volumen de agua consumido por las plantas se ha utilizado como un indicador de WUEa.

Desde el punto de vista fisiológico, el término WUE también denominado eficiencia transpiratoria o WUE instantánea (WUEi) hace referencia a la ratio entre las tasas foliares de fotosíntesis y transpiración (Anyia y Herzog, 2004; Lovelli *et al.*, 2007):

$$WUEi = \frac{\text{Tasa de fotosíntesis } (\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})}{\text{Tasa de transpiración } (\text{mmol agua m}^2 \text{ s}^{-1})} \quad (2)$$

La WUEi así descrita no es un parámetro adimensional ya que describe el número de moléculas de CO₂ incorporadas en el proceso fotosintético en función del número de moléculas de agua que difunden por transpiración a través de los estomas, durante el mismo periodo de tiempo y unidad de superficie foliar.

La WP, no tiene homólogo en el ámbito fisiológico, y se acuñó como término agronómico que hace referencia a la cosecha producida por un cultivo determinado con respecto a la cantidad de agua consumida por el cultivo para obtener dicha producción (Perry *et al.*, 2009; Ragab, 2014) y se expresa como:

$$WP = \frac{\text{Producción del cultivo o Cosecha (Kg)}}{\text{Agua consumida por la planta (m}^3\text{)}} \quad (3)$$

La correlación entre la WUEi y la cantidad de cosecha en cultivos como arroz, maíz o trigo, donde el contenido de materia seca en el grano es muy superior al contenido de agua, ha hecho que algunos autores utilicen las siglas WUE para referirse a la WP (Tambussi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Por otro lado, a pesar de las diferencias de concepto que existen entre la WUEa y la WP, en la literatura hay numerosos ejemplos en los que las siglas WUEa se usan como sinónimo de WP (Chaves y Oliveira, 2004; Katerji *et al.*, 2008; Molina-Montenegro *et al.*, 2011; Medici *et al.*, 2014; Osakabe *et al.*, 2014), generando la confusión de la que se habló al inicio de este apartado.

Es importante destacar que los términos producción y/o cosecha son diferentes dependiendo del tipo de cultivo, de manera que la cosecha final puede referirse al peso seco de semillas (cereales), al peso fresco de frutos (tomate) o incluso al peso fresco de hojas (lechuga, alfalfa, etc) (Heydari, 2014). En el cultivo de tomate, la cosecha está determinada por el peso fresco de los frutos, constituidos por aproximadamente entre un 5 y un 10% de materia seca y entre un 90 y un 95% de agua (Davies *et al.*, 1981). Estos altos porcentajes de agua en los frutos de tomate manifiestan la relevancia que puedan llegar a tener pequeñas variaciones en el balance hídrico de la planta sobre la productividad de este cultivo.

La WUEa ha aumentado en las últimas décadas gracias al desarrollo de las prácticas de riego (Katerji *et al.*, 2008; Soto-García *et al.*, 2013), lo que ha permitido un significativo ahorro de agua en agricultura. A pesar de ello, dichas prácticas por sí mismas no garantizan una alta WP (Bouman, 2007; Perry *et al.*, 2009; Molden *et al.*, 2010), por lo que sería importante considerar las particularidades de cada cultivo relacionadas con su capacidad para capturar el agua de riego, y así poder conseguir un incremento tanto de la WUEa como de la WP.

Puesto que tanto WUEa como WP son parámetros complejos en los que intervienen muchos factores, antes de iniciar un programa de mejora es necesario identificar entre todos los posibles caracteres morfológicos y/o fisiológicos implicados, aquéllos que sean más fáciles de estudiar, y que al mismo tiempo sean estables y presenten una alta heredabilidad. La mayor parte de los programas orientados a la mejora de WUEa y WP se han llevado a cabo en cultivos de cereales, existiendo muy poca información para cultivos hortícolas como el del tomate (Davies *et al.*, 2000; Romero-Aranda *et al.*, 2001; Reina-Sanchez *et al.*, 2005; Tahi *et al.*, 2007) donde, como ya se ha comentado anteriormente, el componente principal de la cosecha es el contenido de agua en el fruto.

Considerando todo lo expuesto, en esta primera fase de estudio se ha investigado la posible existencia de variabilidad en la WUEa (consumo de agua) y en la WP (productividad) de la población RIL. En la evaluación de la WP se partió de la hipótesis de que diferencias en producción de biomasa durante la fase vegetativa podrían conllevar diferencias de producción en la fase generativa de crecimiento y desarrollo de los frutos. Este supuesto se sustenta en estudios realizados en tomate que muestran que una reducción de biomasa durante la fase vegetativa afecta negativamente a todo el periodo reproductivo y por tanto a la producción total de frutos (Patanè *et al.*, 2011). Para desarrollar este objetivo general, se han abordado los siguientes objetivos parciales:

- 1- Determinar si en la población RIL existe variabilidad en la WUEa (cuantificada como el consumo de agua) y en la WP (cuantificada como la producción de biomasa producida por volumen de agua consumida).
- 2- Analizar WUEa y WP en relación a varios parámetros biométricos y de estado hídrico de las plantas.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Material vegetal

En este trabajo se ha estudiado una población RIL derivada del cruce interespecífico entre la especie de tomate doméstico *Solanum lycopersicum* cultivar Moneymaker (en adelante MM) (Fig.1.1A, B, C) y la especie de tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* entrada TO-937 (en adelante TO-937) (Fig.1.1D, E, F). Esta población RIL, en generación F8, se ha desarrollado en el departamento de Mejora Genética y Biotecnología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC) mediante el método del descendiente único (SDD del inglés, *Single Seed Descent*) (Alba, 2006) y ha sido utilizada en diversos estudios de resistencia a plagas (Alba, 2006; Alba *et al.*, 2009; Escobar-Bravo, 2013).

Del total de las 164 líneas que conforman la población RIL, para este estudio se seleccionaron 38 líneas cuyo conjunto refleja la variación existente en la población completa respecto a diversos parámetros de desarrollo vegetativo. Para realizar dicha selección se llevó a cabo un cultivo de primavera-verano en invernadero, durante el cual se realizaron medidas semanales de la altura de la planta, el número de hojas, la superficie de la hoja, la distancia entre inflorescencias y el diámetro de tallo. Las medidas se llevaron a cabo en 6 plantas por línea, desde el momento del trasplante a invernadero hasta que el cultivo entró en fructificación. Estos datos se sometieron a un análisis de conglomerados de k-medias que permitió agrupar las distintas líneas en función de la similitud existente entre ellas para un parámetro determinado y seleccionar una línea RIL representativa de cada uno de los grupos generados.



Figura 1.1. Morfología general de plantas de tomate. (A, D) Aspecto general de la parte aérea, (B, E) de la raíz y (C, E) de los frutos de plantas de tomate de los dos genotipos utilizados como parentales de la población RIL, (A, B, C) *Solanum lycopersicum* cultivar Moneymaker y (D, E, F) *Solanum pimpinellifolium* entrada TO-937.

1.2.2. Condiciones de cultivo

Las plantas de cultivaron en medio hidropónico en condiciones controladas de cámara de cultivo de altas prestaciones (Modelo Fitoclima 27000 EHHF, ARALAB, Lisboa, Portugal) (Fig.1.2) para minimizar el efecto que el ambiente pudiera tener en el fenotipo final. Los 40 genotipos se estudiaron en 5 ciclos de cultivo manteniendo siempre las mismas condiciones ambientales cada uno de ellos (Fig.1.3). Cada ciclo tuvo una duración de 5 semanas y en cada uno de ellos se crecieron y evaluaron los dos genotipos parentales y 4-5 RILs.



Figura 1.2. Cultivo hidropónico en cámara de altas prestaciones. (A) Exterior e (B) interior de la cámara de cultivo de altas prestaciones (Modelo Fitoclima 27000 EHHF, ARALAB, Lisboa, Portugal), donde se llevó a cabo el estudio.

La programación de las variables ambientales en el interior de la cámara de cultivo se definió en base a los datos climáticos registrados durante la primavera de los últimos 10 años, dentro de uno de los invernaderos del IHSM “La Mayora”. Esta programación de la cámara permitía reproducir de forma constante la evolución diaria de la temperatura, radiación y humedad relativa que de forma natural se presenta en el interior de un invernadero en días típicos de primavera (Fig. 1.3).

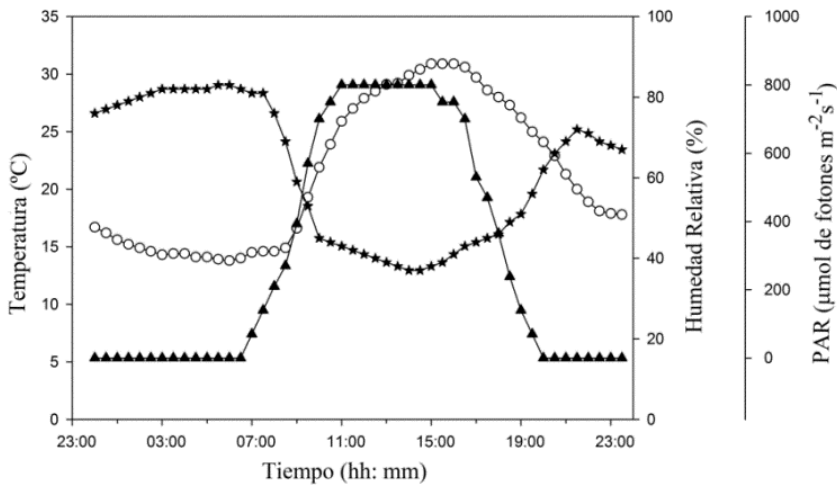


Figura 1.3. Evolución diaria en temperatura —○—, humedad Relativa —★— y radiación (PAR) —▲— en el interior de la cámara de cultivo de altas prestaciones.

Las semillas de los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y de las 38 RILs seleccionadas se esterilizaron por inmersión en hipoclorito sódico al 2-5% (p/v) durante 30 minutos, seguido de varios lavados con agua, y se germinaron en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua, a una temperatura de 25°C y en oscuridad. Cuando la radícula alcanzó unos 3-4 cm de longitud, las plántulas se colocaron en tubos Falcon con solución nutritiva hasta que desarrollaron 3-4 hojas verdaderas (18-24 días tras germinación). En este estadio, se seleccionaron de cada genotipo 12 plantas de tamaño y aspecto general similar para continuar su cultivo en medio hidropónico pero en recipientes de mayor volumen. Así, las plantas se cultivaron hasta el final del ensayo, individualmente en macetas de plástico con 2,9 L de solución nutritiva tipo Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). La solución nutritiva, modificada para tomate (Tabla 1.1) y ajustada a un pH de 5,8 estaba en continua aireación, y se cambió semanalmente durante las 5 semanas que duró el ensayo para evitar desequilibrios en la proporción de los nutrientes.

Tabla 1.1. Composición de la solución nutritiva tipo Hoagland y Arnon (1950) modificada para el cultivo de tomate.

Macronutrientes	mM	Micronutrientes	mM
KNO ₃	6,6	H ₃ BO ₃	0,092
NH ₄ H ₂ PO ₄	1	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,018
MgSO ₄	2,05	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,0016
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	4	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,0006
		(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ * 4 H ₂ O	0,0007
		FeNaEDTA	0,058

1.2.3. Consumo de agua

Semanalmente por gravimetría, se midió el volumen de agua consumido por la planta durante el periodo de estudio (5 semanas). Para ello, a primera hora del día 1 de medida (1 hora después de terminar el periodo de oscuridad en el interior de la cámara), se pesó la maceta con la solución nutritiva, sin la planta,

en una balanza analítica con dos decimales de precisión. Tras la pesada, la planta volvía a colocarse en la maceta correspondiente. Transcurrida una semana, y a primera hora del día 2 de medida, se repitió el procedimiento. Tras esta segunda pesada, la solución nutritiva se desechaba y se sustituía por una nueva, volviendo a colocar cada planta en su maceta correspondiente. El consumo de agua se obtenía por la diferencia de peso entre la medida 2 y la medida 1. Este proceso se repitió semanalmente en 12 plantas por genotipo lo que permitió obtener el consumo de agua total acumulado durante un periodo de 5 semanas consecutivas. La pérdida de agua por evaporación se minimizó utilizando tapaderas de plástico en cada maceta.

1.2.4. Parámetros biométricos

Al final del periodo de ensayo, tras 5 semanas de cultivo en medio hidropónico y en condiciones ambientales estables y óptimas para el cultivo de tomate, se determinó, en 12 plantas por genotipo, la altura de la planta, el número de hojas, el diámetro del tallo entre el primer y segundo entrenudo (usando un pie de rey) y la superficie foliar de todos los folíolos mediante un integrador de área (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK).

1.2.5. Producción de biomasa

En las mismas plantas se determinó el peso fresco de hojas, tallos y raíces por separado. También se determinó el peso seco de cada una de las partes tras 48 h de secado a 70°C. La diferencia entre el peso fresco y el peso seco permitió determinar el contenido de agua en cada órgano.

1.2.6. Variables de intercambio gaseoso

Las variables de intercambio gaseoso: tasa de fotosíntesis neta (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol agua m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y conductancia estomática al vapor de agua (g_s , $\text{mmol agua m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se midieron al final del periodo de ensayo con un sistema portátil de analizadores IRGA (modelo LI-6400; LI-COR, Inc.,

Lincoln, NE, USA) equipado con una fuente de iluminación LED Roja/Azul (6400-02B, LI-COR). Las medidas se realizaron durante el periodo de máxima iluminación en el interior de la cámara de cultivo, correspondiente a una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de $800 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se muestrearon dos folíolos terminales de las hojas 8ª y 9ª contadas desde el ápice, en 6 plantas por genotipo. Las condiciones en el interior de la cámara foliar de medida del sistema LI-COR (temperatura del aire y PAR) fueron establecidas de acuerdo con los valores registrados para estos parámetros en el interior de la cámara de cultivo en el momento de realizar las medidas.

1.2.7. Rendimiento del fotosistema II

Se determinó el rendimiento del fotosistema II midiendo la fluorescencia de las clorofilas con un fluorímetro de fluorescencia modulada (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd. Norfolk, UK). Se muestrearon los mismos folíolos en los que previamente se habían tomado las medidas de intercambio gaseoso. Los parámetros de fluorescencia (F_0 , F_m) se determinaron por el método de pulso de luz saturante (Schreiber *et al.*, 1995) y para ello, antes de realizar las medidas, los folíolos se adaptaron a oscuridad durante 40-50 minutos. A continuación se expusieron a una secuencia de luz modulada de baja intensidad, seguida de un pulso de luz saturante. La aplicación de luz modulada de baja intensidad después del periodo de oscuridad permite determinar la fluorescencia basal (F_0) que refleja el estado de oxidación de los centros de reacción del fotosistema II, cuando están oxidados y disponibles para la transferencia de electrones. La aplicación posterior de un pulso de luz saturante permite determinar la fluorescencia máxima (F_m) provocada por la completa reducción de los centros de reacción, que bloquean la transferencia de electrones entre plastoquinonas A y B. La diferencia entre F_m y F_0 permite el cálculo de la fluorescencia variable (F_v) asociada a alteraciones químicas en el fotosistema II. La ratio F_v/F_m es un indicador robusto de la eficiencia máxima de este fotosistema (Murchie y Lawson, 2013), por lo que se consideró conveniente

determinar esta ratio para así poder analizar posibles efectos de la eficiencia del fotosistema II en relación a las medidas de fotosíntesis neta que pudieran determinar diferencias en la producción de biomasa.

1.2.8. Contenido relativo de agua

Tras la medida de las variables de intercambio gaseoso y rendimiento del fotosistema II, en las mismas hojas se determinó el contenido relativo de agua (CRA). A la hora de máxima radiación PAR en el interior de la cámara, se muestrearon 2 folíolos por planta (6 plantas) de cada genotipo que se pesaron inmediatamente en una balanza de precisión para obtener su peso fresco (PF). A continuación, el peciolo de cada folíolo se introducía en agua durante 4 h. Transcurrido este periodo, se procedía a la pesada de los folíolos en la balanza de precisión para obtener el peso de saturación o de turgor máximo (PT). Por último, se determinó el peso seco (PS) de los folíolos tras 24 h de secado a 70°C. El CRA se calculó mediante la siguiente fórmula (Barrs y Weatherley, 1962):

$$CRA = \frac{PF - PS}{PT - PS} \times 100 \quad (4)$$

1.2.9. Cálculo de WUEi y WP

Los valores registrados para las tasas de fotosíntesis y transpiración se utilizaron para el cálculo de WUEi, según la siguiente fórmula:

$$WUEi = \frac{\text{Tasa de fotosíntesis } (\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})}{\text{Tasa de transpiración } (\text{mmol agua m}^2 \text{ s}^{-1})} \quad (2)$$

La productividad del agua (WP) se calculó a partir de la ratio entre la biomasa de la planta, registrada al final del periodo de cultivo, y el consumo acumulado de agua durante el mismo periodo (5 semanas). Con estos datos se calculó la WP_{PF} (WP en base al peso fresco de la parte aérea) y WP_{PS} (WP en base al peso seco de la parte aérea) mediante las expresiones:

$$WP_{PF} = \frac{\text{Biomasa vegetativa fresca (Kg)}}{\text{Agua total consumida (m}^3\text{)}} \quad (5)$$

$$WP_{PS} = \frac{\text{Biomasa vegetativa seca (Kg)}}{\text{Agua total consumida (m}^3\text{)}} \quad (6)$$

1.2.10. Análisis estadístico y cálculo de la heredabilidad

El análisis estadístico de todos los datos registrados se llevó a cabo con el programa SPSS versión 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). Todos los datos se relativizaron al parental doméstico MM para así reducir los efectos de escala entre ciclos de cultivo en la cámara. Así, los valores de los parámetros analizados se presentan como el porcentaje relativo a la media de los valores registrados en el parental MM (representado como el 100%). Siempre que fue necesario, los datos se transformaron para obtener una distribución normal y una heterocedasticidad de la varianza. Los datos se sometieron posteriormente a un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Para aquellos parámetros dónde no se cumplió la hipótesis nula (existía una diferencia significativa entre genotipos), se realizó un contraste post-hoc de Dunnet ($P \leq 0,05$) en el que el parental doméstico actuaba como control.

Posteriormente, además de un análisis de correlación de Pearson para determinar la relación existente entre los distintos parámetros, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para reducir la matriz de datos multivariantes a una representación bidimensional (ter Braak, 1995). A continuación, se realizaron dos análisis de regresión lineal múltiple para determinar qué parámetros explicaban de manera significativa las varianzas observadas en el consumo de agua y en WP. En cada uno de estos análisis se eliminaron variables que al ser redundantes podrían enmascarar el resultado. En el primero de ellos, en el que el consumo de agua actuó como variable dependiente, se optó por eliminar WP de las variables independientes. En el segundo análisis, donde la variable dependiente fue WP, se excluyeron del

análisis el consumo de agua, el peso fresco de la parte aérea, y el agua presente en las hojas o tallos.

La variabilidad genética de los parámetros registrados en las líneas RILs seleccionadas se estimó mediante el análisis de los componentes de la varianza (ANOVA), usando genotipo como factor aleatorio. El componente de la varianza debida al genotipo (entre RILs) se utilizó para estimar la varianza genética (σ_G^2) y el componente de la varianza de error en el análisis (varianza dentro de las RILs) se empleó para estimar la varianza ambiental (σ_E^2), ya que las líneas RILs son prácticamente homocigotas y por tanto se espera que la varianza dentro de las RILs sea debida únicamente a factores no genéticos. La heredabilidad de un parámetro en sentido amplio (H^2), que es el cociente entre la varianza genética y la ambiental, se calculó mediante la siguiente fórmula (Visscher et al, 2008):

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2} \quad (7)$$

Donde σ_G^2 y σ_E^2 corresponden a la varianza genética y a la varianza ambiental, respectivamente.

1.3. Resultados

1.3.1. Consumo de agua

El consumo acumulado de agua por parte de las plantas durante el periodo de 5 semanas mostró variaciones significativas en el conjunto de las líneas RILs analizadas (Fig. 1.4). De las 38 líneas evaluadas, 6 presentaron un consumo de agua superior al registrado en el parental doméstico MM. Este incremento osciló entre un ~20% (RILs 161, 17 y 98) y un ~50 % (RILs 112, 14 y 38). Por el contrario, 23 líneas presentaron un consumo significativamente inferior al registrado en MM siendo esta reducción de un 65% (RIL 121), un 55% (RIL 9), un ~48% (parental silvestre TO-937 y RILs 68, 175 y 124), un ~34% (RILs 84, 92, 120, 20, 179, 88 y 111) y un ~25% (RILs 12, 73, 77, 65, 66, 114, 94, 59, 115 y 151).

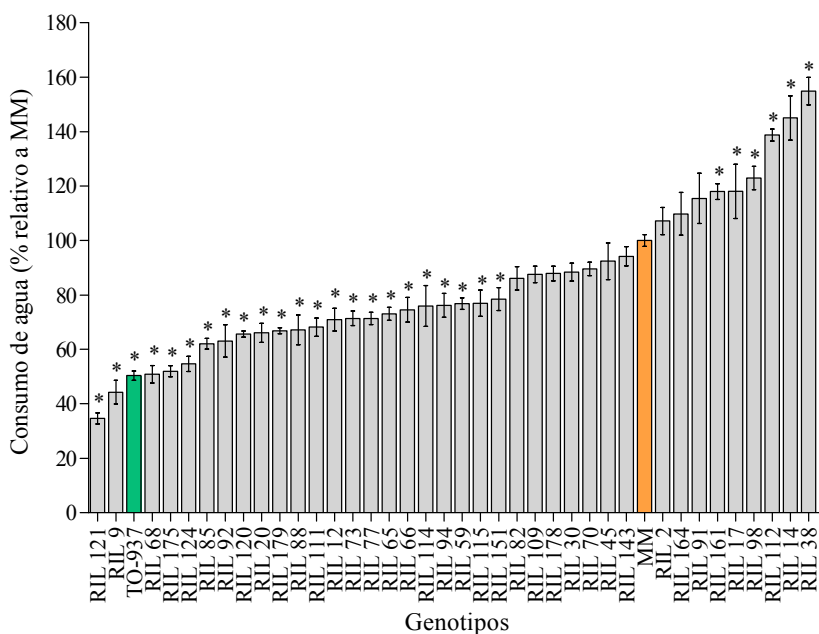


Figura 1.4. Consumo de agua acumulado registrado durante 5 semanas en 38 líneas RILs derivadas del cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker, MM) y *Solanum pimpinellifolium* (ac. TO-937). Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnett, $p \leq 0,05$.

1.3.2. Parámetros biométricos

En el conjunto de las líneas RILs analizadas, se observaron diferencias significativas en todos los parámetros relacionados con el crecimiento de la parte aérea de las plantas.

En relación a la altura de la planta, se observó una gran variabilidad entre las distintas líneas RILs, registrándose diferencias del 70% entre algunas de ellas (Fig.1.5). Más de la mitad de las líneas RILs presentaron mayor altura con respecto al parental MM, oscilando este incremento entre un 24%, caso de la RIL 77, y más de un 50%, como la RIL 17. Por otra parte, tres líneas RILs presentaron una altura de la planta entre el 20 y el 30% inferior al registrado en el parental doméstico (RILs 9, 121 y 68).

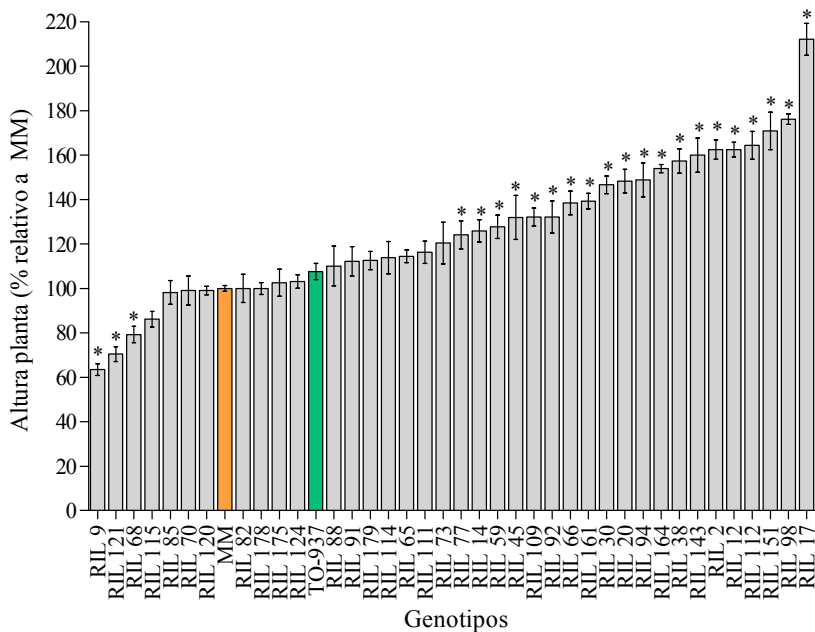


Figura 1.5. Altura de la planta registrada en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE ($n = 12$ plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

El diámetro del tallo, medido al final del periodo de 5 semanas, presentó una variación de más del 50% entre algunas de las líneas RILs. Para la mayoría de ellas, el diámetro del tallo fue inferior al registrado en el parental MM, oscilando esta reducción entre un 17%, caso de la RIL 151, y un 54%, como la RIL 143. La excepción fueron las líneas RILs 94, 66 y 38 que presentaron valores de diámetro de tallo estadísticamente similares al de MM (Fig.1.6).

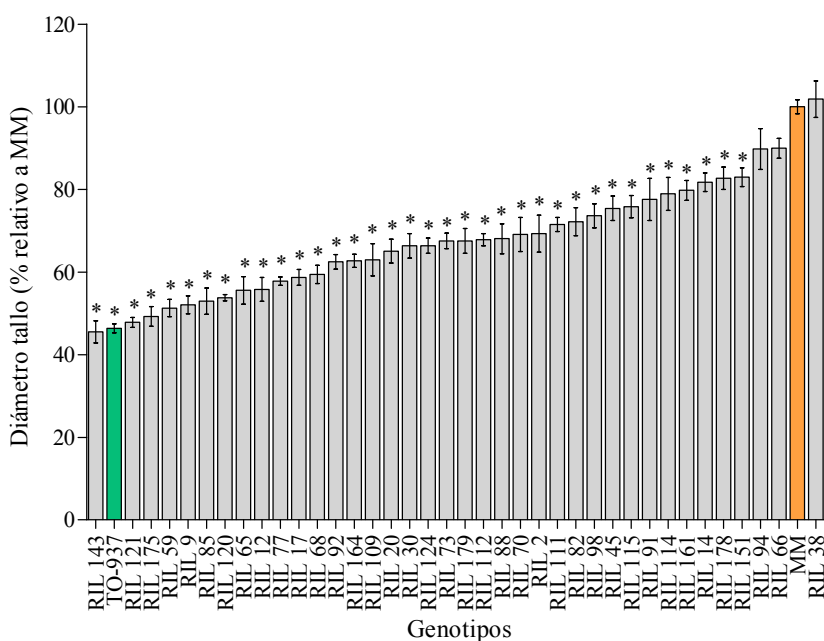


Figura 1.6. Diámetro del tallo registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE ($n = 12$ plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

Tanto el número de hojas como la superficie total de las mismas presentaron diferencias significativas entre las distintas líneas RILs. Estas diferencias fueron más acusadas en la superficie foliar, registrándose diferencias de más del 80% entre algunas de ellas. En el número de hojas se registraron diferencias entre algunas RILs de hasta un 40% (Fig.1.7). Cabe destacar que hubo un grupo de líneas que junto con MM no presentaron diferencias en el número de hojas pero sí en la superficie foliar. Por ejemplo, la RIL 14, que presentando valores

similares en el número de hojas, presentó una superficie foliar un 30% superior a la de MM y un 40% superior a la de la RIL 88.

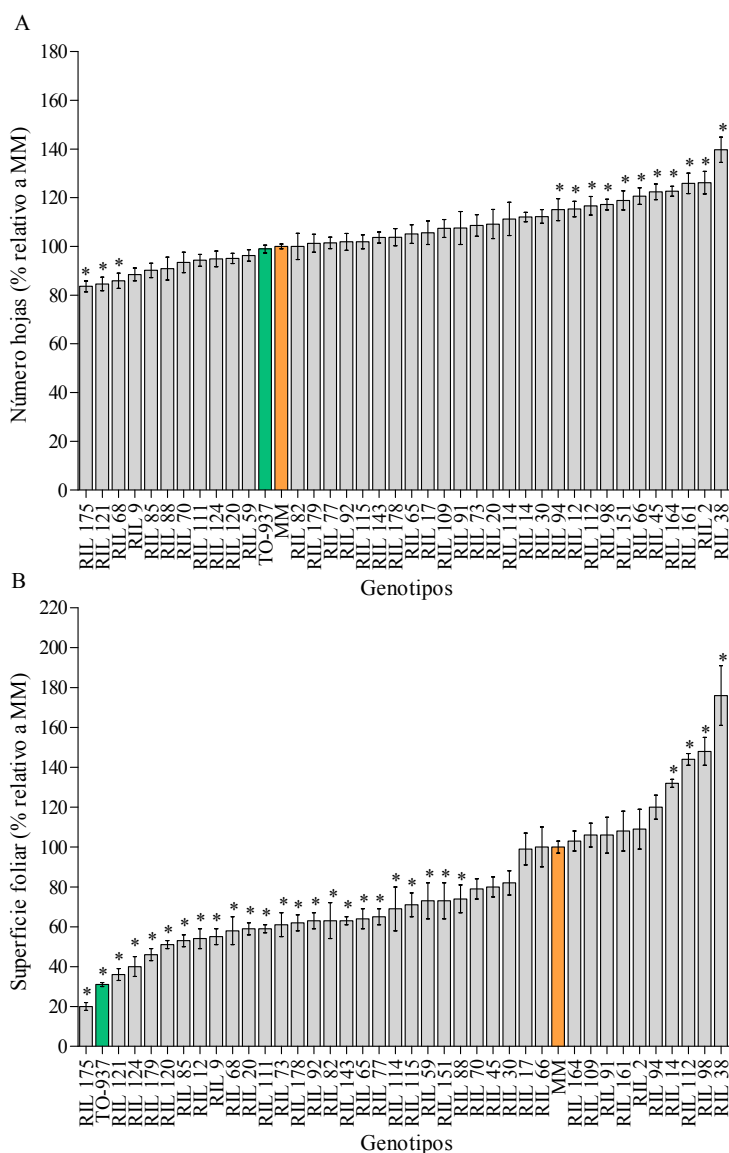


Figura 1.7. (A) Número de hojas y (B) superficie foliar total registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

1.3.3. Producción de biomasa

Con respecto a la producción de biomasa de la parte aérea, se registró una variación significativa entre las líneas RILs, registrándose diferencias en los valores de peso fresco y peso seco de más de un 80% entre algunas de ellas. La mayoría de las líneas presentaron un valor de biomasa inferior o similar a MM, a excepción de las RILs 98, 112 y 38 que presentaron valores de peso fresco y seco más de un 20% superiores al del parental MM (Tabla 1.2).

El peso fresco de las raíces no se consideró dada la dificultad en conseguir un secado completo del agua superficial de las mismas. Como consecuencia, sólo se presentan los datos de peso seco de la raíz, que al igual que en la parte aérea muestran una variación significativa entre las líneas RILs (Tabla 1.2). Algunas de las líneas presentaron valores de peso seco de raíz en torno a un 40% (RIL 98, 164, 77 y 38), un 60% (RIL 2, 30 y 112) e incluso un 90% (RIL 14) superiores al registrado en MM. También hubo líneas en las que se registraron valores de peso seco significativamente inferiores a los registrados en MM, siendo esta reducción de aproximadamente un 73% (RILs 121 y 124), un 64% (RILs 175 y 68), un 56% (RILs 88, 179 y TO-937), un 45% (RILs 9, 85, 151, 92 y 59) y un 34% (RILs 20, 120 y 65).

El contenido de agua en hojas y tallos estimado como la diferencia entre los pesos fresco y seco de estos órganos, presentó una gran variación entre las líneas analizadas (Fig.1.8). Con respecto al contenido de agua en la hoja, alrededor de un tercio de las líneas analizadas presentaron valores inferiores al de MM, llegando a tener algunas de ellas en torno a un 33% menos de agua que MM (RILs 12, 179 y 175) (Fig.1.8A). En relación al contenido de agua en el tallo, alrededor de una cuarta parte de las líneas analizadas presentaron valores significativamente inferiores al registrado en MM, siendo esta reducción de más de un 20% en algunas de ellas (RILs 115, 77 y 9). 7 líneas RILs presentaron valores de contenido de agua en los tallos significativamente superiores al

registrado en MM, alcanzando en torno a un 20% más de agua en las líneas RILs 88, 161, 45,66 y 124 e incluso más de un 30% en las RILs 179 y 151 (Fig.8B).

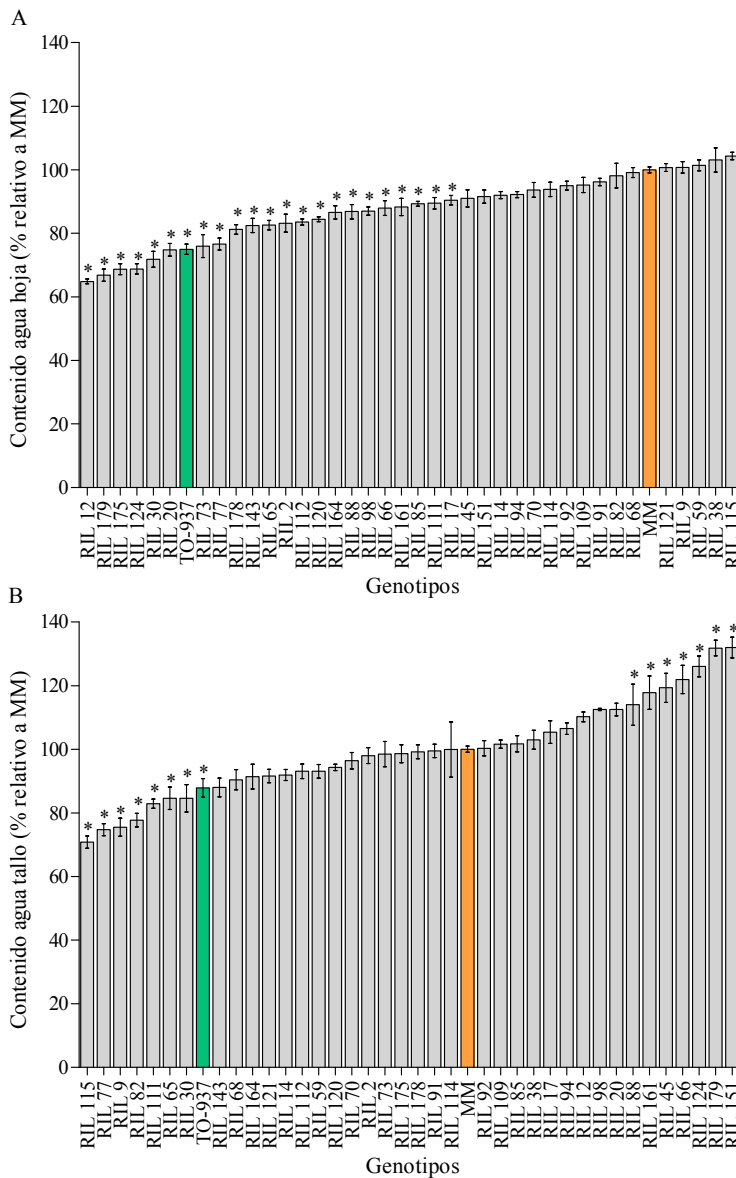


Figura 1.8. (A) Contenido de agua en hojas y (B) en tallos registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

Tabla 1.2. Producción de biomasa registrada en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas (% relativo a MM). Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$. T, Tallo. H, Hojas. R, Raíz.

Genotipos	Peso Fresco	Peso Seco		Genotipos	Peso Fresco	Peso Seco	
	T + H	T + H	R		T + H	T + H	R
MM	100 \pm 4	100 \pm 3	100 \pm 3	RIL 88	69 \pm 8*	54 \pm 8*	42 \pm 9*
TO-937	23 \pm 1*	32 \pm 2*	44 \pm 3*	RIL 91	94 \pm 9	98 \pm 14	124 \pm 21
RIL 2	89 \pm 7	117 \pm 11	167 \pm 19*	RIL 92	48 \pm 5*	39 \pm 8*	56 \pm 6*
RIL 9	41 \pm 4*	41 \pm 5*	52 \pm 6*	RIL 94	86 \pm 6	84 \pm 6	95 \pm 6
RIL 12	55 \pm 4*	65 \pm 6*	106 \pm 13	RIL 98	122 \pm 6*	136 \pm 7*	140 \pm 6*
RIL 14	109 \pm 5	110 \pm 8	191 \pm 11*	RIL 109	94 \pm 6	83 \pm 6	98 \pm 9
RIL 17	77 \pm 6*	90 \pm 10	109 \pm 13	RIL 111	41 \pm 1*	42 \pm 1*	68 \pm 5
RIL 20	54 \pm 3*	63 \pm 3*	64 \pm 13*	RIL 112	126 \pm 3*	127 \pm 5*	174 \pm 10*
RIL 30	70 \pm 4*	88 \pm 5	173 \pm 15*	RIL 114	78 \pm 15	79 \pm 14	72 \pm 4
RIL 38	155 \pm 15*	148 \pm 12*	152 \pm 17*	RIL 115	59 \pm 3*	69 \pm 4*	87 \pm 6
RIL 45	73 \pm 5*	80 \pm 3	79 \pm 7	RIL 120	48 \pm 1*	55 \pm 2*	66 \pm 1*
RIL 59	53 \pm 5*	43 \pm 5*	59 \pm 4*	RIL 121	28 \pm 2*	31 \pm 3*	24 \pm 2*
RIL 65	51 \pm 4*	45 \pm 5*	67 \pm 7*	RIL 124	39 \pm 5*	41 \pm 4*	28 \pm 2*
RIL 66	87 \pm 9	84 \pm 9	77 \pm 10	RIL 143	55 \pm 3*	58 \pm 5*	94 \pm 7
RIL 68	42 \pm 5*	39 \pm 5*	36 \pm 4*	RIL 151	73 \pm 6*	63 \pm 3*	56 \pm 4*
RIL 70	75 \pm 5*	81 \pm 6	90 \pm 6	RIL 161	110 \pm 8	104 \pm 7	110 \pm 11
RIL 73	56 \pm 4*	67 \pm 5*	80 \pm 3	RIL 164	80 \pm 2	98 \pm 6	143 \pm 9*
RIL 77	51 \pm 3*	67 \pm 5*	147 \pm 18*	RIL 175	22 \pm 2*	30 \pm 2*	35 \pm 4*
RIL 82	49 \pm 6*	59 \pm 7*	82 \pm 12	RIL 178	79 \pm 5	81 \pm 5	105 \pm 7
RIL 85	44 \pm 3*	47 \pm 2*	53 \pm 4*	RIL 179	49 \pm 2*	38 \pm 3*	47 \pm 5*

1.3.4. Variables de intercambio gaseoso

Las tasas de fotosíntesis (A) y transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se utilizaron junto con los valores de superficie foliar para estimar la fotosíntesis (Ap), la transpiración (Ep) y la conductancia estomática (gsp) de la planta entera. Más de la mitad de las líneas analizadas presentan valores inferiores a los obtenidos en MM (Tabla 1.3). Únicamente las líneas RIL 112, 98 y 38 mostraron unos valores de Ap y Ep significativamente superiores a los

calculados para MM, siendo este incremento de un 35%, un 60% y un 100% respectivamente. Con respecto a la conductancia estomática estimada para la planta entera, las líneas RIL 98 y 38 mostraron valores superiores al registrado en MM, siendo este incremento un 91% y un 118% respectivamente.

Tabla 1.3. Variables de intercambio gaseoso (% relativo a MM) registradas al final del periodo de estudio en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 6 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$. A, fotosíntesis. E, transpiración. gs, conductancia estomática.

Genotipos	A planta	E planta	gs planta	Genotipos	A planta	E planta	gs planta
MM	100 \pm 4	100 \pm 4	100 \pm 5	RIL 88	63 \pm 6*	43 \pm 8*	31 \pm 8*
TO-937	27 \pm 1*	24 \pm 2*	21 \pm 2*	RIL 91	106 \pm 14	90 \pm 13	84 \pm 18
RIL 2	120 \pm 12	103 \pm 10	106 \pm 17	RIL 92	46 \pm 6*	38 \pm 5*	29 \pm 5*
RIL 9	56 \pm 5*	59 \pm 6*	63 \pm 8	RIL 94	97 \pm 5	70 \pm 6*	55 \pm 7*
RIL 12	54 \pm 5*	38 \pm 4*	30 \pm 5*	RIL 98	153 \pm 10*	169 \pm 14*	191 \pm 21*
RIL 14	105 \pm 9	84 \pm 8	57 \pm 7*	RIL 109	102 \pm 12	98 \pm 15	102 \pm 19
RIL 17	83 \pm 10	72 \pm 8	59 \pm 8*	RIL 111	49 \pm 3*	45 \pm 4*	40 \pm 6*
RIL 20	58 \pm 6*	38 \pm 5*	29 \pm 5*	RIL 112	139 \pm 5*	130 \pm 5*	126 \pm 9
RIL 30	90 \pm 6	76 \pm 5	74 \pm 6	RIL 114	67 \pm 10*	49 \pm 8*	39 \pm 7*
RIL 38	206 \pm 19*	197 \pm 21*	228 \pm 29*	RIL 115	54 \pm 9*	51 \pm 8*	42 \pm 8*
RIL 45	90 \pm 6	87 \pm 6	97 \pm 14	RIL 120	42 \pm 3*	42 \pm 2*	33 \pm 3*
RIL 59	68 \pm 9*	64 \pm 10*	56 \pm 11*	RIL 121	36 \pm 4*	32 \pm 3*	31 \pm 3*
RIL 65	62 \pm 6*	53 \pm 7*	50 \pm 9*	RIL 124	35 \pm 5*	27 \pm 3*	23 \pm 2*
RIL 66	110 \pm 12	121 \pm 16	138 \pm 25	RIL 143	46 \pm 7*	54 \pm 5*	51 \pm 7*
RIL 68	49 \pm 9*	36 \pm 7*	29 \pm 7*	RIL 151	61 \pm 9*	56 \pm 9*	45 \pm 8*
RIL 70	78 \pm 4	81 \pm 4	81 \pm 4	RIL 161	116 \pm 12	119 \pm 15	139 \pm 28*
RIL 73	65 \pm 6*	69 \pm 8*	77 \pm 11	RIL 164	103 \pm 11	85 \pm 7	66 \pm 8
RIL 77	76 \pm 5	59 \pm 5*	62 \pm 8	RIL 175	15 \pm 2*	18 \pm 2*	17 \pm 2*
RIL 82	62 \pm 7*	53 \pm 4*	46 \pm 3*	RIL 178	71 \pm 5*	68 \pm 7*	73 \pm 11
RIL 85	48 \pm 3*	42 \pm 4*	35 \pm 5*	RIL 179	40 \pm 3*	48 \pm 4*	50 \pm 5*

1.3.5. Rendimiento del fotosistema II

La ratio Fv/Fm fue similar, con valores en torno a 0,83, con variaciones del 2-3% con respecto al de MM (Fig.1.9). Aunque en algunos casos estas diferencias fueron significativas, no debe considerarse que tengan relevancia

fisiológica puesto que se encuentran dentro de los límites óptimos descritos en la literatura, esto es, entre 0,75 y 0,85 (Bolh  r-Nordenkamp y   quist, 1993; Murchie y Lawson, 2013).

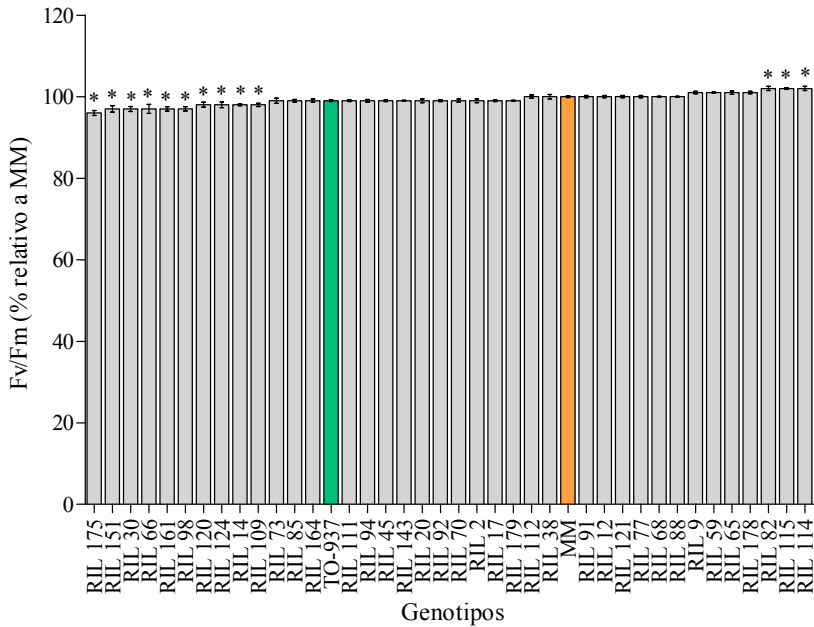


Figura 1.9. Rendimiento del fotosistema II (Fv/Fm) registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 6 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

1.3.6. Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua en la hoja (CRA), es una medida del contenido de agua respecto del agua total que el tejido puede contener cuando est   totalmente hidratada. Por tanto este parámetro permite conocer el estado hídrico foliar como resultado del balance entre absorción y transporte de agua desde la raíz y la difusión por transpiración hacia la atmósfera. Los valores de CRA mostraron diferencias significativas entre las distintas líneas, siendo estos valores en torno a un 8% superior (RILs 124, 65, 98 y 68) y un 9% inferiores (RILs 2, 30, 77, 38 y 12) al registrado en MM (Fig.1.10).

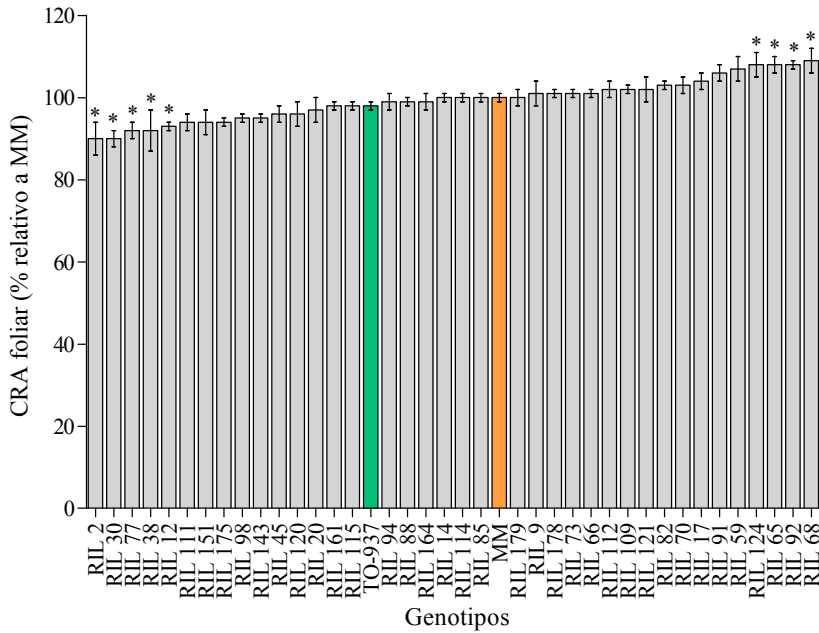


Figura 1.10. Contenido relativo de agua (CRA) foliar registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

1.3.7. Eficiencia transpiratoria (WUEi) y productividad del agua (WP)

Desde un punto de vista fisiológico los resultados obtenidos en el cálculo de la ratio fotosíntesis/transpiración (WUEi), mostraron diferencias significativas en la población RIL (Fig.1.11). La mayoría de las líneas mostraron valores similares a los registrados en el parental doméstico MM, sin embargo en 9 líneas el valor de WUEi fue significativamente superior al obtenido en MM. Este incremento osciló entre aproximadamente un 30% (RILs 12, 114, 94, 68, 124, 77 y 14) y un 57% (RILs 20 y 88).

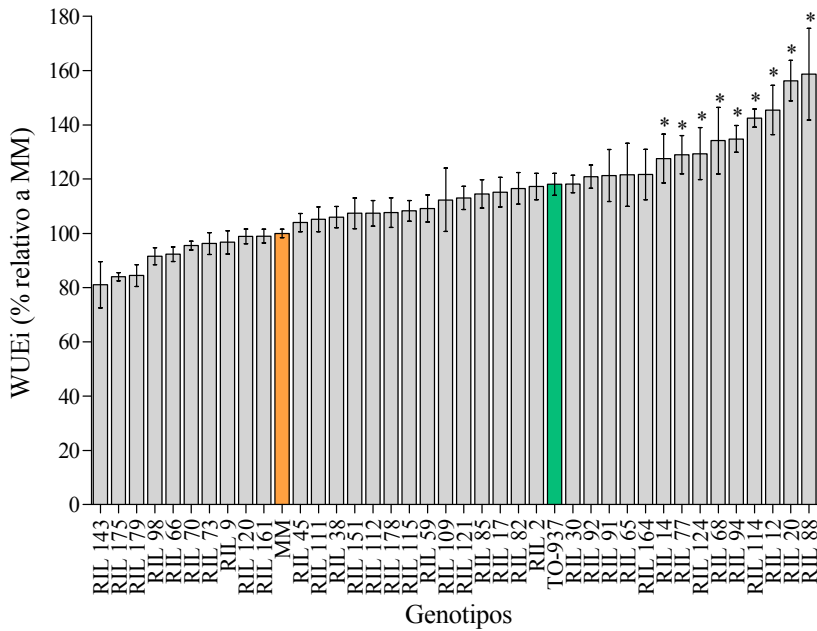


Figura 1.11. Eficiencia transpiratoria (WUEi) registrado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnet, $p \leq 0,05$.

Desde un punto de vista agronómico, la productividad del volumen de agua consumido en términos de cantidad de biomasa producida (WP) también mostró una variación significativa entre las líneas RILs evaluadas (Fig.1.12). La WP calculada en base al peso fresco (WP_{PF}, Fig.1.12A) mostró, en más de la mitad de las líneas analizadas, valores significativamente inferiores a los registrados en el parental doméstico MM, oscilando esta reducción entre un 20%, caso de la RIL 73, y un 57%, como la RIL 175.

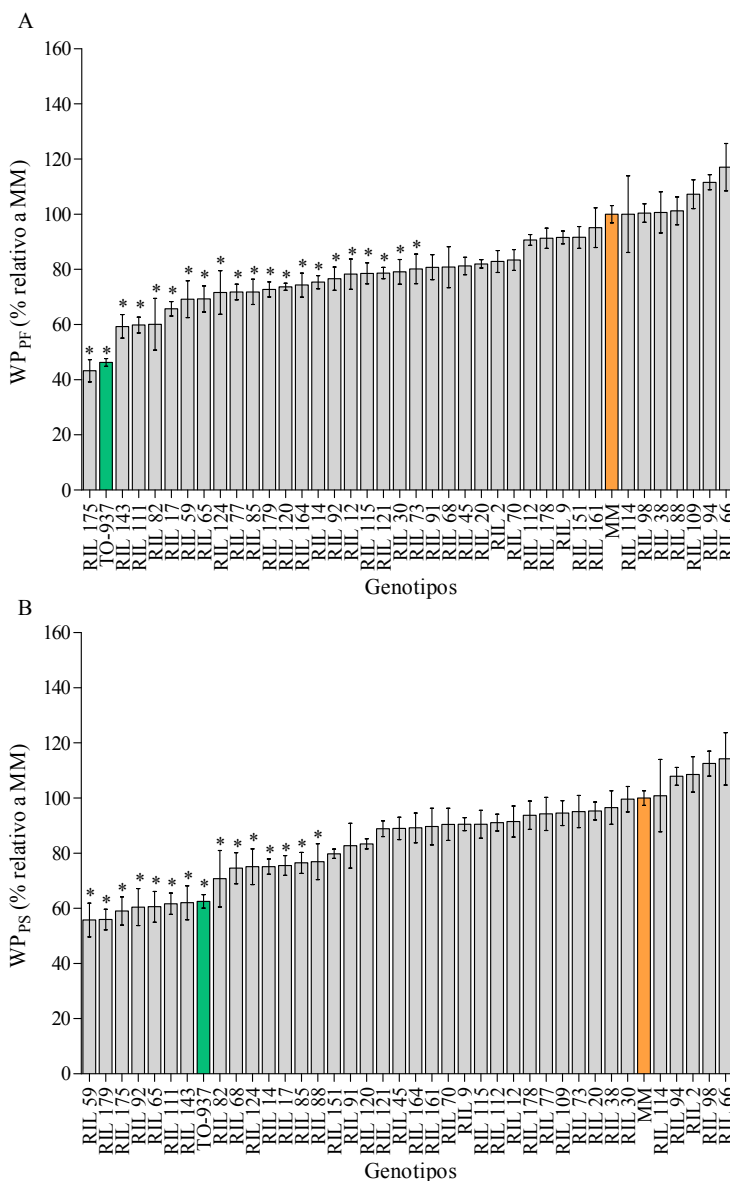


Figura 1.12. Productividad del agua calculada en base (A) al peso fresco (WP_{PF}) y (B) al peso seco (WP_{PS}) de la parte aérea registrada en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 12 plantas por genotipo). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a MM según el test de Dunnett, $p \leq 0,05$.

Cuando WP se calculó en base al peso seco (WP_{PS}) (Fig.1.12B) se observó que las líneas que presentaron valores de WP_{PF} significativamente inferiores a

MM (RILs 77, 120, 164, 12, 115, 121, 30 y 73), presentaban valores de WP_{PS} similares a MM. Por otro lado, líneas que presentaron igual valor que MM para WP_{PF} (RILs 68 y 88), mostraron valores significativamente inferiores a MM en WP_{PS} .

1.3.8. Relación entre WP y el consumo de agua con los parámetros biométricos y fisiológicos registrados

Como ya se ha dicho anteriormente, dado que en la fase inicial del desarrollo de las plantas no hay frutos, la WP se calculó en base a producción de biomasa vegetativa. Además, como el contenido de agua del fruto es el principal componente del índice de cosecha en el cultivo de tomate (Davies *et al.*, 1981), en el análisis de productividad agronómica se consideró la productividad calculada en base al peso fresco de la parte aérea de las plantas (WP_{PF}). En la figura 1.13 se muestra la relación entre WP_{PF} y el consumo de agua. Puede observarse que, a igualdad de consumo de agua, los valores de WP_{PF} difieren en más de un 50% entre algunas de las líneas analizadas (RIL 66, 94, 114, 151, 115 y 59). Además, un número de RILs (RIL 38, 98, 114 y 88) presentaron diferentes valores de consumo de agua aunque similares valores de WP_{PF} . Estos resultados indican que el mismo valor de WP_{PF} puede alcanzarse con diferentes cantidades de consumo de agua.

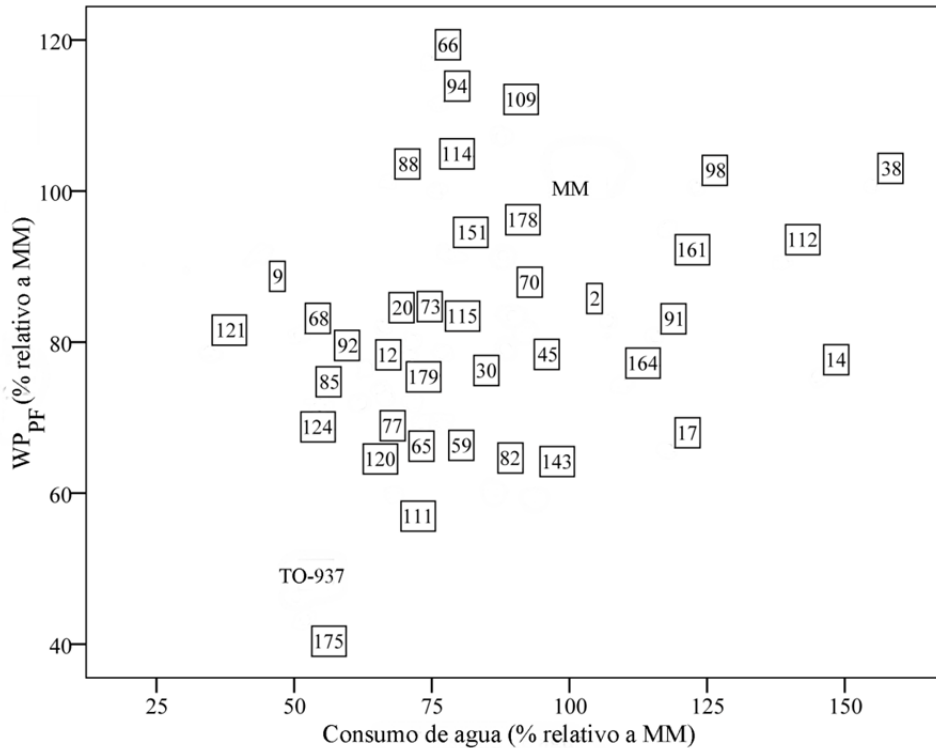


Figura 1.13. Relación entre productividad del agua calculada en base al peso fresco de la parte aérea de las plantas (WP_{PF}) y consumo de agua registrado durante 5 semanas consecutivas en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas. Los números en el interior de los cuadrados son el código con el cual se nombró a cada una de las RILs.

1.3.8.1. Análisis de correlación

Se realizó un análisis de correlación con todos los datos registrados para los 40 genotipos analizados. (Tabla 1.4). Este análisis reveló que el consumo de agua está más fuertemente correlacionado con el número de hojas y la superficie foliar ($r = 0.71^{**}$ y 0.89^{**} , respectivamente) que con la altura o el diámetro del tallo ($r = 0.60^{**}$ y 0.54^{**} , respectivamente). Por otra parte, la WP_{PF} está más correlacionada con el diámetro del tallo ($r = 0.66^{**}$) que con el número de hojas o la superficie foliar ($r = 0.45^{**}$ y 0.59^{**} , respectivamente). Además la WP_{PF} también presentó una correlación positiva con el agua presente en la hoja (AH, 0.35^{*}) y en el tallo (AT, 0.38^{**}).

De entre los parámetros fisiológicos cabe destacar que los coeficientes de correlación obtenidos entre WP_{PF} y las fotosíntesis y transpiración de la planta entera ($r = 0.60^{**}$ y 0.58^{**} , respectivamente) no superaban el valor de correlación registrado entre WP_{PF} y diámetro del tallo ($r = 0.66^{**}$). También se pudo constatar la no relevancia del rendimiento del fotosistema II o de la WUE_i como indicadores de la WP_{PF} pues se obtuvieron coeficientes de correlación de 0.05 y 0.12, respectivamente.

Por último, este análisis confirmó la no correlación existente entre consumo de agua y WP ($r = 0.27$)

1.3.8.2. Análisis de componentes principales (ACP)

Para poder identificar los parámetros que pueden explicar mejor la variabilidad encontrada tanto en el consumo de agua como en la WP , se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en el que se incluyeron todos los parámetros medidos y derivados. Este análisis mostró que los componentes 1 y 2 explican el 65% de la varianza total observada en el conjunto de datos. La figura 1.14 muestra gráficamente el resultado del ACP en el que puede observarse que la mayoría de las variables se agrupan en torno al consumo de agua (C) y a la productividad agronómica expresada en base al peso fresco (WP_{PF}) y al peso seco (WP_{PS}) de la parte aérea de las plantas. Alejadas de esta agrupación quedan algunas variables biométricas como la altura de la planta (Al) y otras fisiológicas como la eficiencia del fotosistema II (F_v/F_m). Cabe destacar, que este análisis apunta de nuevo al diámetro del tallo como el parámetro más próximo a la WP_{PF} .

Tabla 1.4. Análisis de correlación de Pearson en el que se han incluido las siguientes variables: C, consumo de agua acumulado; AI, altura de la planta; DT, diámetro del tallo; NH, número de hojas; SF, superficie foliar; PFae, peso fresco parte aérea; PSae, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; AH, contenido de agua en las hojas; AT, contenido de agua en el tallo; Ap, fotosíntesis planta entera; Ep, transpiración planta entera; gsp, conductancia estomática planta entera; FvFm, rendimiento del fotosistema II; RWC, contenido relativo de agua foliar; WPPF, productividad del agua en relación al peso fresco de la parte aérea de las plantas; WPPS, productividad del agua en relación al peso seco de la parte aérea de las plantas; WUEi, ratio entre fotosíntesis y transpiración. ** La correlación de Pearson es significativa con una $p < 0,01$. * La correlación de Pearson es significativa con una $p < 0,05$.

	C	AI	DT	NH	SF	PFae	PSae	P-PSR	AH	AT	Ap	Ep	gsp	FvFm	CRA	WPPF	WPPS	WUEi
C	1	0,60**	0,54**	0,71**	0,89**	0,90**	0,91**	0,83**	0,20	0,07	0,85**	0,81**	0,72**	-0,08	-0,19	0,27	0,30	-0,13
AI	0,60**	1	0,18	0,70**	0,56**	0,52**	0,57**	0,54**	-0,22	0,36*	0,51**	0,47**	0,41**	-0,34*	-0,35*	0,15	0,22	0,04
DT	0,54**	0,18	1	0,58**	0,64**	0,72**	0,64**	0,37*	0,32*	0,33*	0,64**	0,61**	0,57**	0,01	-0,13	0,66**	0,52**	-0,01
NH	0,71**	0,70**	0,58**	1	0,73**	0,76**	0,78**	0,66**	-0,01	0,33*	0,78**	0,73**	0,69**	-0,18	-0,40*	0,45**	0,52**	0,01
SF	0,89**	0,56**	0,64**	0,73**	1	0,96**	0,93**	0,76**	0,36*	0,11	0,96**	0,91**	0,83**	-0,09	-0,16	0,59**	0,52**	-0,04
PFae	0,90**	0,52**	0,72**	0,76**	0,96**	1	0,95**	0,73**	0,29	0,24	0,94**	0,92**	0,85**	-0,07	-0,19	0,65**	0,56**	-0,07
PSae	0,91**	0,57**	0,64**	0,78**	0,93**	0,95**	1	0,85**	0,19	0,12	0,94**	0,90**	0,83**	-0,10	-0,32*	0,53**	0,65**	-0,07
PSR	0,83**	0,54**	0,37*	0,66**	0,76**	0,73**	0,85**	1	0,00	-0,20	0,75**	0,67**	0,59**	-0,08	-0,41**	0,22	0,47**	0,00
AH	0,20	-0,22	0,32*	-0,01	0,36*	0,29	0,19	0,00	1	-0,29	0,30	0,30	0,25	0,39*	0,32*	0,35*	0,11	-0,06
AT	0,07	0,36*	0,33*	0,33*	0,11	0,24	0,12	-0,20	-0,29	1	0,12	0,16	0,18	-0,43**	0,00	0,38*	0,12	0,00
Ap	0,85**	0,51**	0,64**	0,78**	0,96**	0,95**	0,94**	0,75**	0,30	0,12	1	0,97**	0,92**	-0,07	-0,23	0,60**	0,60**	-0,08
Ep	0,81**	0,47**	0,61**	0,73**	0,91**	0,92**	0,90**	0,67**	0,30	0,16	0,97**	1	0,98**	-0,14	-0,22	0,58**	0,56**	-0,30
gsp	0,72**	0,41**	0,57**	0,69**	0,83**	0,85**	0,83**	0,59**	0,25	0,18	0,92**	0,98**	1	-0,16	-0,24	0,56**	0,56**	-0,37*
FvFm	-0,08	-0,34*	0,01	-0,18	-0,09	-0,07	-0,10	-0,08	0,39*	-0,43**	-0,07	-0,14	-0,16	1	0,31	0,05	-0,04	0,36*
CRA	-0,19	-0,35*	-0,13	-0,40*	-0,16	-0,19	-0,32*	-0,41**	0,32*	0,00	-0,23	-0,22	-0,24	0,31	1	-0,02	-0,36*	0,10
WPPF	0,27	0,15	0,66**	0,45**	0,59**	0,65**	0,53**	0,22	0,35*	0,38*	0,60**	0,58**	0,56**	0,05	-0,02	1	0,75**	0,12
WPPS	0,30	0,22	0,52**	0,52**	0,52**	0,56**	0,65**	0,47**	0,11	0,12	0,60**	0,56**	0,56**	-0,04	-0,36*	0,75**	1	0,10
WUEi	-0,13	0,04	-0,01	0,01	-0,04	-0,07	-0,07	0,00	-0,06	0,00	-0,08	-0,30	-0,37*	0,36*	0,10	0,12	0,10	1

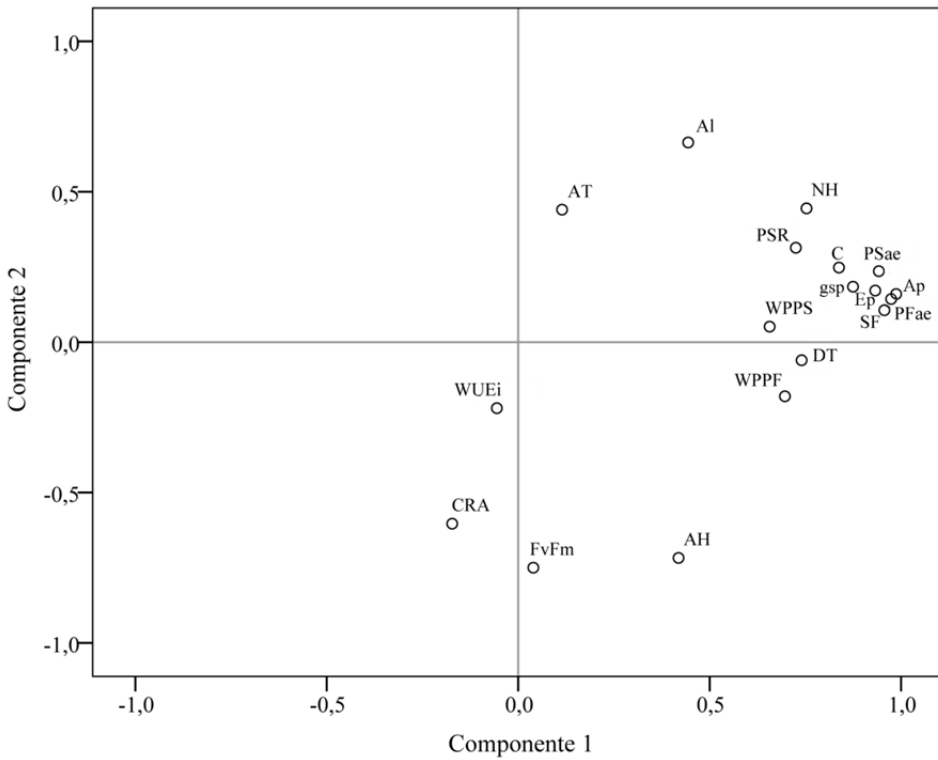


Figura 1.14. Análisis de componentes principales (ACP) en el que se han incluido las siguientes variables: C, consumo de agua acumulado; Al, altura de la planta; DT, diámetro del tallo; NH, número de hojas; SF, superficie foliar; PFae, peso fresco parte aérea; PSae, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; AH, contenido de agua en las hojas; AT, contenido de agua en el tallo; Ap, fotosíntesis planta entera; Ep, transpiración planta entera; gsp, conductancia estomática planta entera; FvFm, rendimiento del fotosistema II; RWC, contenido relativo de agua foliar; WPPF, productividad del agua en relación al peso fresco de la parte aérea de las plantas; WPPS, productividad del agua en relación al peso seco de la parte aérea de las plantas; WUEi, ratio entre fotosíntesis y transpiración.

1.3.8.3. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos

Para determinar que parámetros explicaban de manera significativa la varianza encontrada tanto en el consumo de agua como en WP, se realizaron varios análisis de regresión lineal múltiple por pasos. Desde este punto de vista, el peso seco de la parte aérea fue el parámetro que mejor explicaba la variabilidad encontrada en el consumo de agua (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos en el que la variable dependiente fue el consumo de agua. El coeficiente de tipificación β muestra la importancia relativa de cada parámetro. PSae, peso seco de la parte aérea.

Modelo	Parámetro	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	23,779	4,808		4,945	0,000
	PSae	0,834	0,062	0,910	13,491	0,000

El análisis de regresión lineal múltiple en el que la variable dependiente fue WP_{PF} , reveló que el parámetro que mejor explicaba la varianza observada en WP_{PF} fue el diámetro del tallo (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos en el que la variable dependiente fue WP_{PF} . El coeficiente de tipificación β te muestra la importancia relativa de cada parámetro. DT, diámetro de tallo.

Modelo	Parámetro	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	28,760	9,868		2,915	0,006
	DT	0,772	0,142	0,660	5,419	0,000

1.3.9. Estimación de la heredabilidad

Los datos obtenidos en la población RIL con respecto a los parámetros fisiológicos, biométricos, de producción de biomasa y derivados muestran una gran variabilidad entre las líneas RILs. Este hecho permitió estimar el coeficiente de heredabilidad para cada uno de ellos (Tabla 1.7). Todos los caracteres analizados, a excepción del contenido relativo de agua foliar, presentaron una heredabilidad elevada, considerándose así cuando se presentan valores por encima de 0,50 (Stanfield, 1971).

Tabla 1.7. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) estimada para los parámetros morfológicos y fisiológicos en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 38 líneas RILs seleccionadas.

Parámetros	Heredabilidad (H^2)
Morfológicos	
Altura de la planta	0,84
Diámetro del tallo	0,76
Superficie foliar	0,81
Número de hojas	0,64
Peso fresco de la parte aérea	0,79
Peso seco de la parte aérea	0,76
Peso seco de la raíz	0,77
Fisiológicos	
Consumo de agua	0,85
Fotosíntesis	0,77
Transpiración	0,76
Conductancia estomática	0,70
Fluorescencia de las clorofilas	0,63
Contenido relativo foliar	0,45
Contenido de agua en las hojas	0,81
Contenido de agua en el tallo	0,77
Productividad del agua (en base al peso fresco)	0,56
Productividad del agua (en base al peso seco)	0,53
WUEi	0,53

1.4. Discusión

El sistema de cultivo hidropónico adoptado en este estudio y las condiciones ambientales controladas en cámara de cultivo, garantizaron para todos los genotipos un 100% de disponibilidad de agua y las mismas condiciones de demanda evaporativa en el medio que rodeaba la parte aérea de las plantas. En estas condiciones, los datos obtenidos mostraron una variación significativa en el consumo de agua de más del 70% entre algunas de las líneas RILs (Fig.1.4). Al tratarse de un cultivo hidropónico, donde las raíces no sufren una limitación por la disponibilidad del agua, las diferencias de consumo podrían atribuirse a diferencias asociadas a la capacidad de la raíz para absorber agua y/o a diferencias en la demanda de agua de la parte aérea.

Los resultados obtenidos muestran una elevada correlación entre el consumo de agua y el peso seco de la raíz ($r = 0,83^{**}$), pudiendo significar que un mayor desarrollo del sistema radicular puede favorecer una mayor entrada de agua en la planta. Sin embargo, a pesar de la elevada correlación entre el consumo de agua y el peso seco de la raíz, se dio el caso de líneas que aun mostrando un valor de peso seco de raíz superior (RILs 30, 2, 77 y 164) con respecto al parental MM (73%, 67%, 47% y un 43%, respectivamente) , registraron un consumo de agua un 29% inferior (RIL 77) o en torno a un 18% superior (RILs 30, 2 y 164) con respecto al registrado en MM. Por otro lado, también se observaron líneas que a pesar de consumir un 18% más de agua con respecto al parental MM (RILs 161 y 17), registraron un valor de peso seco de raíz similar a MM. Por tanto, las diferencias en el consumo de agua encontradas en la población RIL deben atribuirse, además de a las diferencias registradas entre RILs en su capacidad para absorber agua, a otros factores, lo que pone de manifiesto la necesidad de avanzar en el conocimiento acerca de qué parámetros determinan dicho consumo de agua.

Se observó una correlación positiva entre el consumo de agua y los parámetros que determinan un mayor desarrollo de la parte aérea como son los parámetros de crecimiento y de intercambio gaseoso. Sin embargo, las diferencias registradas en estos parámetros, no siempre explicaban la variabilidad presente en el consumo de agua. Para ello se realizó un análisis de regresión múltiple que desveló que fue el peso seco de la parte aérea el parámetro que mejor explicaba la variabilidad presente en el consumo de agua (Tabla 1.4). Este peso seco de la parte aérea es considerado como un parámetro integrativo a lo largo del tiempo, ya que incluye diferentes órganos (hojas y tallos) y procesos (como la fotosíntesis y transpiración) (Tambussi *et al.*, 2007). Además, nuestro estudio demostró que este parámetro presentó una alta heredabilidad en sentido amplio (Tabla 1.7). Todo esto parece indicar que el peso seco de la parte aérea es uno de los parámetros candidatos para ser introducido en un posible programa de mejora de la WUEa.

El análisis de la productividad del agua (WP) es complejo de abordar debido a la cantidad de procesos involucrados, entre los que se incluyen la capacidad de las raíces para capturar el agua y de los órganos para almacenarla, la pérdida de agua por transpiración foliar, así como la competencia que surge entre distintos órganos (hojas, tallos y frutos) en periodos concretos del desarrollo de las plantas y/o en periodos de estrés hídrico ambiental.

En esta primera evaluación de la WP en la población RIL el estudio se basó en los trabajos de Patanè *et al.* (2011) que muestran que un mayor desarrollo vegetativo condiciona una mayor producción en el cultivo de tomate. Los resultados obtenidos mostraron una alta variabilidad de la WP_{PF} , que presentaban una correlación positiva con los parámetros que determinaron tanto la producción de materia seca (fotosíntesis) como el flujo de agua hacia la parte aérea de la planta (superficie foliar y transpiración). Pero la alta variabilidad observada en el consumo de agua no explicaba la variabilidad registrada en la WP_{PF} . Todo ello indicaba que además del consumo de agua, la fotosíntesis y

transpiración foliar, en la WP_{PF} de tomate había que tener en cuenta la cantidad de agua retenida en la planta. En este sentido el diámetro del tallo fue el parámetro que mejor explicaba la varianza observada en WP_{PF} (Tabla 1.6). A su vez, el diámetro del tallo presentó una correlación positiva con el contenido de agua en el mismo. Así, RILs como la RIL 66 que presentó los valores más altos de WP_{PF} , también mostró los valores más elevados de diámetro de tallo y su contenido en agua.

La capacidad de las plantas para almacenar agua en los tallos es considerada como un buen indicador de su potencial para combatir la sequía en ambientes semi-áridos, evitando la deshidratación foliar (Chirino *et al.*, 2011). En situaciones de alta demanda evaporativa, un mayor contenido de agua almacenada en el tallo podría evitar desequilibrios en el suministro de agua a las hojas asociados al tiempo necesario para que el agua llegue desde las raíces. En el cultivo de tomate está documentado que la alta demanda transpiratoria, frecuente a mediodía en el interior de los invernaderos, determina deshidratación foliar y significativas pérdidas de cosecha (Romero-Aranda *et al.* 2002). También hay estudios que apuntan la existencia de competencia por el agua entre hojas y frutos en situaciones de alta demanda evaporativa (Guichard *et al.*, 2005). Un mayor contenido de agua en el tallo de las plantas de tomate podría facilitar un mayor y más rápido suministro de agua a las hojas y frutos, evitando la deshidratación foliar y manteniendo el flujo hídrico necesario tanto para la fisiología foliar como para el crecimiento el fruto. Pequeñas reducciones en el aporte de agua a los frutos, ocasionadas por la competencia con la transpiración foliar de mediodía, puede determinar a lo largo del tiempo un menor crecimiento del fruto y por tanto pérdida de cosecha.

Algunas de las limitaciones en el desarrollo de programas de mejora están relacionadas con el volumen de trabajo que supone la medida de los parámetros indicadores del carácter que se quiere mejorar. La medida de estos parámetros debe ser rápida, fácil de llevar a cabo y con un alto grado de heredabilidad. El

presente trabajo muestra que todos los parámetros presentaron una heredabilidad elevada, a excepción del contenido relativo de agua que mostró una heredabilidad media (Tabla 1.7). Tanto la alta heredabilidad del diámetro del tallo ($H^2 = 0,76$) como el hecho de que fuese el parámetro que mejor explicaba la variabilidad presente en la WP_{PF} , lo señalan como un carácter susceptible de ser considerado en futuros programas de mejora de la WP de tomate.

Los resultados presentados a lo largo de este capítulo muestran que la mejora de WP en el cultivo de tomate debería orientarse a mantener un elevado nivel de reserva de agua cerca de las hojas para evitar la deshidratación foliar en situaciones de aumento repentino de transpiración foliar, así como maximizar la absorción de agua por las raíces para compensar la pérdida por transpiración. Partiendo del hecho de que esta población RIL presenta una alta variabilidad en el consumo de agua y en otros parámetros asociados de la parte aérea como son la transpiración, se plantea la hipótesis de que todo ello debe estar sustentado en una variabilidad de la conductividad hidráulica de las raíces. El estudio de la conductividad hidráulica y algunos parámetros que pueden estar condicionándola, se exponen en los siguientes capítulos de la presente memoria.

CAPÍTULO 2

CONDUCTIVIDAD HIDRÁULICA DE LA RAÍZ DE TOMATE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2.1. Introducción

2.1.1. Movimiento del agua en la planta

Una de las funciones básicas de la raíz es suministrar el agua que requiere la parte aérea para su propio crecimiento y para compensar las pérdidas por transpiración (Steudle y Peterson, 1998; Nardini *et al.*, 2011). De esta forma, la raíz es el primer eslabón en el modelo «continuo suelo-planta-atmósfera» (modelo CSPA, en inglés SPAC) (van den Honert, 1948). Según este modelo, donde se introdujo la ley de Ohm como analogía para el flujo de agua, la planta actúa como un conductor, en el que dicho flujo se enfrenta a diferentes resistencias localizadas en el sistema radicular, en la unión entre la raíz y el tallo y en la parte aérea (Fig.2.1).

La fuerza que permite superar las resistencias al flujo de agua y favorece tanto la captación de agua en la raíz como el transporte a larga distancia hacia tallos y hojas, se origina por gradientes en el potencial hídrico ($\Delta\Psi_w$). Por definición, el potencial hídrico (Ψ_w) es la energía libre que presentan las moléculas de agua para su desplazamiento (Nobel, 1999). A presión atmosférica y a 25°C de temperatura, estado de referencia del Ψ_w donde todas las moléculas pueden moverse libremente, esta energía corresponde a 0 MPa. La diferencia de Ψ_w entre dos puntos determina su desplazamiento, de manera que el flujo del agua es directamente proporcional a la magnitud del $\Delta\Psi$, siendo la dirección del movimiento del agua desde potenciales hídricos altos a potenciales hídricos más bajos (Kramer y Tejada, 1974; Steudle, 2001).

El potencial hídrico (Ψ_w) depende de la suma de todas las fuerzas que pueden actuar en una determinada parte del sistema y que se recogen en la siguiente fórmula:

$$\Psi_w = \Psi_p - \Psi_\pi + \Psi_m + \Psi_g \quad (8)$$

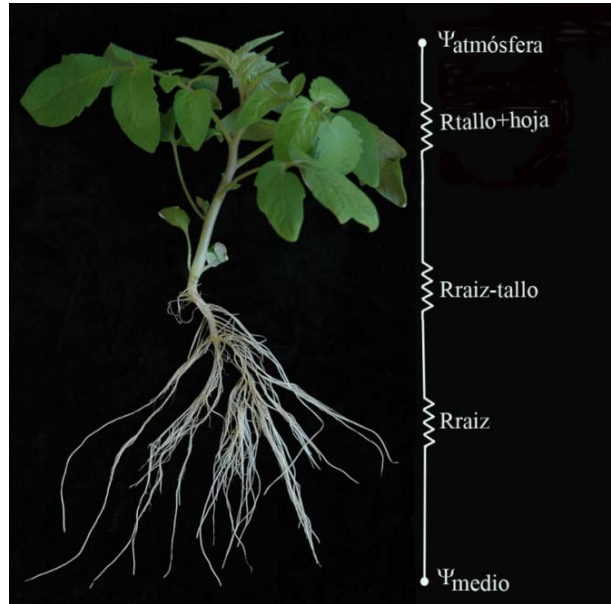


Figura 2.1. Modelo continuo suelo-planta-atmósfera donde se representa el flujo del agua como un flujo dinámico continuo a lo largo de distintos compartimentos de la planta, desde la fuente (medio de cultivo) hasta el sumidero final (atmósfera). En este movimiento, el flujo del agua se enfrenta a la resistencia presente en la raíz (Rraíz), en la unión raíz-tallo (Rraíz-tallo) y en la parte aérea (Rtallo-hoja). Se presenta una plántula de tomate (25 días de edad) con la representación esquemática de la planta como un conductor.

La presión hidrostática o de turgencia (Ψ_p) hace referencia a la presión física hidrostática que el agua ejerce en un determinado punto del sistema pudiendo tomar valores positivos cuando se genera en el interior de la célula debido a la rigidez de la pared celular, o valores negativos en el interior del xilema debido a la tensión generada por la transpiración (Tyree y Jarvis, 1982; Taiz y Zeiger, 2010).

La presión osmótica (Ψ_π) hace referencia al potencial químico del agua en una solución que presenta sustancias disueltas. El Ψ_π presenta siempre valores negativos puesto que las sustancias disueltas interfieren en el desplazamiento de las moléculas de agua y su valor depende de la concentración de solutos en solución, siendo este más negativo cuanto mayor sea la concentración de solutos (Passioura, 1982).

La presión matricial (Ψ_m) representa los mecanismos de retención del agua en el suelo (Passioura, 1982), por lo que puede considerarse nulo para el cultivo hidropónico utilizado en esta memoria. Por otro lado, la presión gravitacional (Ψ_g) también se omite en plantas herbáceas porque este componente afecta al valor del Ψ_w en 0,1 MPa cada 10 metros de desplazamiento en vertical y por lo tanto sólo se considera en plantas de gran altura y/o raíces profundas (Connor *et al.*, 1977; Tyree, 2003).

En situaciones de bajas tasas de transpiración (días muy húmedos y con baja radiación o durante la noche), los gradientes de Ψ_π son el principal componente que determina el movimiento del agua desde el medio exterior hacia el interior de la raíz y de ahí hacia el resto de la planta (Passioura, 1982; Kramer, 1983). En situaciones de transpiración elevada, es la presión negativa en el interior del xilema (Ψ_p) el principal componente que determina el movimiento del agua a través de la planta. Esta presión o tensión negativa se origina como consecuencia de la evaporación del agua en las paredes celulares de las cavidades subestomáticas de la hoja. La tensión se transmite a lo largo de la columna de agua en el xilema, gracias a la elevada fuerza de cohesión que presentan las moléculas de agua y la rigidez de los vasos xilemáticos (Steudle, 2001).

A pesar de que las características estructurales del xilema son bien conocidas, el conocimiento de la dinámica del flujo del agua en él es limitado (Kim *et al.*, 2014). De forma general, el xilema proporciona una vía de baja resistencia para el movimiento de agua a larga distancia desde el suelo hacia las hojas, siendo aquellos vasos que presenten un mayor diámetro y una mayor longitud los que proporcionen un mayor flujo de agua (Jeje y Zimmermann, 1979). En situaciones de tasas de transpiración elevada, el xilema es vulnerable a procesos de embolismo (o cavitación) que llevan a una interrupción en el flujo del agua (Tyree y Sperry, 1989; Zimmermann *et al.*, 2004), y/o a una posible reducción de las tasas de fotosíntesis y de la producción de biomasa debido al cierre estomático (Hölttä *et al.*, 2009; Nardini *et al.*, 2011). La presión radicular es un

parámetro clave para reparar embolismos y evitar la cavitación en los vasos xilemáticos (Tyree y Sperry, 1989). En los últimos años se ha propuesto que la reparación de los procesos de embolismo puede estar mediada por unas proteínas transmembranales que producen el co-transporte de agua y sustratos (iones y/o azúcares) desde el apoplasto colindante hacia el vaso xilemático dañado. Dichos iones y/o azúcares serían transportados de nuevo hacia el apoplasto, manteniendo así el gradiente de concentración necesario que impulsaría el co-transporte de agua (Wegner, 2014).

2.1.2. Movimiento del agua en la raíz

El movimiento de agua en la raíz presenta dos componentes: el radial y el axial (Steudle y Peterson, 1998). El movimiento radial se produce desde el medio externo hacia el interior del cilindro vascular atravesando distintas membranas celulares (células de la epidermis y exodermis, del córtex y de la endodermis) (Passioura, 1988). Una vez que el agua y los solutos disueltos en ella, que constituye lo que se denomina savia, alcanza el interior del cilindro vascular, tiene lugar el movimiento axial a través de los lúmenes de los vasos xilemáticos hacia la parte aérea de la planta. En las dos trayectorias que debe seguir el agua en su movimiento a través de la raíz se presentan resistencias que limitan su desplazamiento, siendo esta resistencia mayor en el movimiento radial que en el axial (Steudle, 1989; Steudle y Frensch, 1996).

El movimiento radial de agua en la raíz puede producirse por tres vías (apoplástica, simplástica y transmembranal) según el «*modelo compuesto del transporte radial de agua*» propuesto por Steudle y Peterson (1998). Este modelo propone que el agua puede desplazarse por una: **vía apoplástica** en la que el agua se mueve a través de las paredes celulares y los espacios intercelulares; por una **vía simplástica** en la que el movimiento del agua se produce de unas células a otras a través del citoplasma, sin tener que atravesar membranas, mediante los plasmodesmos que comunican células contiguas; y

por una **vía transmembranal** en la que el agua se mueve de unas células a otras atravesando tanto las membranas plasmáticas como las vacuolares. Hasta la fecha, no hay ninguna técnica capaz de diferenciar entre la vía simplástica y la vía transmembranal por lo que el transporte conjunto que tiene lugar a través de ellas se denomina transporte célula a célula. Este transporte puede ocurrir por simple difusión o mediante proteínas transportadoras específicas denominadas canales de agua o acuaporinas (Chrispeels y Maurel, 1994) (Fig.2.2). El porcentaje de agua que se mueve por cada una de estas tres vías depende del ciclo circadiano y varía según las condiciones ambientales de cultivo.

Este modelo, propuesto para maíz (*Zea mays*), explica el transporte del agua en función de la intensidad de la fuerza motriz. Durante el día, cuando la transpiración es elevada, predomina la vía apoplástica, ya que esta vía presentaría menor resistencia hidráulica al no tener que atravesar ninguna membrana hasta llegar a la endodermis. Mientras que durante la noche, predomina la vía célula a célula generada por la presión radicular, que muestra una mayor resistencia hidráulica al tener que atravesar las distintas membranas celulares (Steudle y Frensch, 1996; Steudle y Peterson, 1998; Steudle, 2000). Sin embargo, trabajos posteriores en maíz (*Zea mays*) (Fritz y Ehwald, 2011) o en cebada (*Hordeum vulgare*) (Knipfer y Fricke, 2010; Knipfer y Fricke, 2011) ponen de manifiesto que el «*modelo compuesto del transporte radial de agua*» debe ser revisado, ya que durante el día, en condiciones de alta transpiración, el transporte de agua por vía apoplástica no es tan alto como cabría esperar, incluso en algunos casos lo que predomina es el transporte vía célula a célula. Recientemente, se ha propuesto que el flujo radial del agua podría ser una combinación del efecto de gradientes de potencial osmótico y de la actividad de proteínas co-transportadoras de agua e iones (Wegner, 2014). Este co-transporte de agua estaría mediado por unas proteínas denominadas KCC que en arroz se localizan mayoritariamente en la membrana plasmática de las células parenquimáticas del xilema (Kong *et al.*, 2011). A través de estas proteínas se

produciría el co-transporte de potasio y cloro junto con moléculas de agua. Este tipo de co-transporte presenta una estequiometría de 160 a 500 moléculas de agua por par de iones co-transportado, según los experimentos llevados a cabo en células epiteliales de mamíferos (Zeuthen, 2010). Sin embargo, se necesita más información para poder corroborar estos valores en las células vegetales (Wegner, 2014).

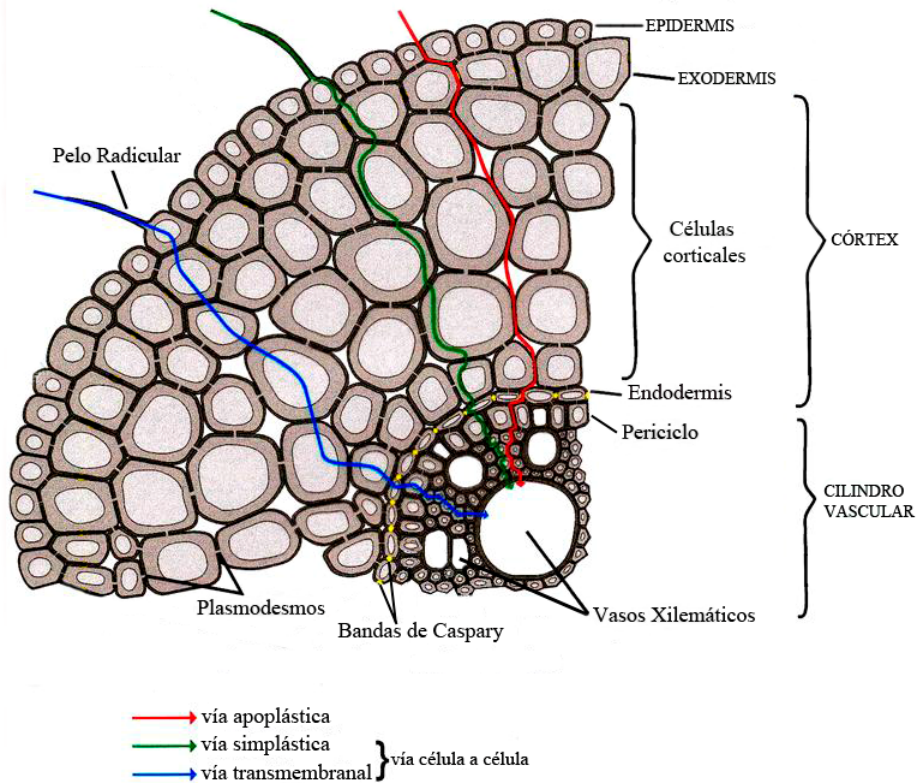


Figura 2.2. Modelo compuesto del flujo radial de agua en el interior de la raíz. El movimiento del agua desde el medio exterior a la raíz hacia el interior de los vasos xilemáticos se produce por tres vías: la vía apoplástica (flecha roja), la vía simplástica (flecha verde), y la vía transmembranal (flecha azul). La vía simplástica y la vía transmembranal se engloban en la vía denominada célula a célula. (Esquema tomado de Knipfer (2010), adaptado de Steudle (2000)).

2.1.3. Conductividad hidráulica de raíz

El flujo de agua desde el medio externo a la raíz hacia el interior de los vasos xilemáticos depende tanto de la fuerza motriz como de la resistencia presente en

las vías por las que el flujo del agua discurre (Boyer, 1985). Una medida de esta resistencia es la **conductancia hidráulica de la raíz** (L_r , $\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) que equivale a la inversa de la resistencia, y se puede expresar mediante la siguiente fórmula:

$$L_r = \frac{Q}{\sigma \times \Delta\Psi\pi} \quad (9)$$

Donde Q es la tasa del flujo de agua ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), σ corresponde al coeficiente de reflexión de los solutos en las membranas y paredes celulares de la raíz (es adimensional y suele tomar el valor de 1) y $\Delta\Psi\pi$ es el gradiente de presión osmótica (MPa), determinado por la diferencia de potencial osmótico que presenta la savia en el xilema y el potencial osmótico que presenta la solución acuosa que rodea a la raíz.

Al estandarizar la medida de conductancia hidráulica (L_r) con respecto a parámetros biométricos de la raíz, se obtiene la **conductividad hidráulica de la raíz** (L_{pr}), que se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$L_{pr} = L_r \times \frac{1}{D} \quad (10)$$

Donde D es la dimensión de la raíz (longitud, superficie o peso seco) (Tyree *et al.*, 1998). Por lo tanto, L_{pr} puede adquirir varias unidades según esté estandarizada a la superficie ($\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$), a la longitud ($\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) o al peso seco de la raíz ($\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{g}^{-1}$).

Un error muy común que aún hoy se encuentra en la bibliografía es la confusión en el uso de los términos L_r y L_{pr} . Mientras que la L_r no tiene en cuenta las dimensiones de la raíz, la L_{pr} sí incorpora este parámetro (Bramley *et al.*, 2007), lo cual puede ser relevante a la hora de comparar genotipos.

Existen diversos métodos para determinar experimentalmente la conductividad hidráulica, tanto de raíces individuales como del sistema radicular completo, que difieren en la naturaleza de la fuerza motriz aplicada (fuerzas de

presión externa e internas). Entre los sistemas experimentales que utilizan fuerzas de presión externa se encuentran el *método de la bomba de vacío*, donde el flujo del agua es inducido aplicando fuerzas de succión al sistema radicular (presión negativa), y el *método de la sonda de presión radicular*, donde el sistema radicular es sometido a presiones externas (presión positiva). En el *método de libre exudado* la fuerza motriz es interna y viene determinada por el gradiente de presión osmótica generado por la propia raíz (Miller, 1985; Bramley *et al.*, 2007; Knipfer y Fricke, 2010).

Está ampliamente documentado que la producción de biomasa está correlacionada con el balance hídrico de la parte aérea y que este depende de la capacidad de las raíces para absorber agua tanto de forma pasiva (asociada a la transpiración) como de forma activa (asociada a gradientes osmóticos). Por otra parte, la absorción radicular de agua de forma activa facilita la reparación de los embolismos, con el consiguiente beneficio para el estado hídrico y la producción de biomasa (Brodersen y McElrone, 2013). Por tanto, dadas las implicaciones que todo ello puede tener en la WP del cultivo de tomate, se decidió avanzar en la generación de conocimiento sobre población RIL, planteándose como siguiente objetivo determinar si en ella existe variabilidad en la capacidad de sus raíces para de absorber agua de forma activa, determinando la Lpr en base a la fuerza motriz interna generada por los gradientes de presión osmótica. En el cumplimiento de este objetivo general se plantearon como objetivos parciales:

- Poner a punto el sistema de medida de la conductividad hidráulica en raíces de tomate
- Determinar en plantas de 13 líneas RILs que diferían en su WP_{PF} , la Lpr calculada en base a la longitud, a la superficie y al peso seco de las raíces.
- Determinar el efecto de la edad de la planta y el consiguiente desarrollo radicular sobre la Lpr.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Considerando los resultados presentados en el capítulo 1, además de los dos genotipos parentales, MM y TO-937, se seleccionaron 13 líneas RILs en base a los valores de productividad del agua (WP_{PF}) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Líneas RILs seleccionadas en base a los valores de WP_{PF} , obtenidos en el capítulo 1, para la determinación de Lpr.

Baja WP_{PF}	Media WP_{PF}	Alta WP_{PF}
TO-937	RIL 2	MM
RIL 59	RIL 68	RIL 38
RIL 65	RIL 73	RIL 66
RIL 175	RIL 115	RIL 94
	RIL 121	RIL 98
		RIL 112

Una vez esterilizadas y germinadas mediante el mismo protocolo detallado en el capítulo 1 (ver inicio página 42), se seleccionaron aquellas plántulas que presentaban radículas con una longitud de 2-3 cm, que se colocaron directamente en solución nutritiva Hoagland diluida a la mitad (ver capítulo 1, Tabla 1.1, página 42) diluida a la mitad, contenida en tubos tipo Falcon de paredes opacas y 50 mL de capacidad. Las plántulas en los tubos Falcon se mantuvieron en la cámara de cultivo tipo Fitotrón hasta alcanzar los 21 días después de germinación (DDG) (Fig.2.3A), momento en el que se llevó a cabo parte de las medidas de Lpr usando entre 11 y 43 plantas por genotipo (genotipos parentales y líneas RILs). Diariamente se aportó nueva solución nutritiva para compensar el consumo durante ese tiempo y suministrar oxígeno. Las condiciones en el interior del fitotrón fueron de 16°C y 24°C de temperatura nocturna y diurna respectivamente, con un fotoperiodo de 8 h de oscuridad y 16 h de luz, siendo la intensidad de radiación (PAR) de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

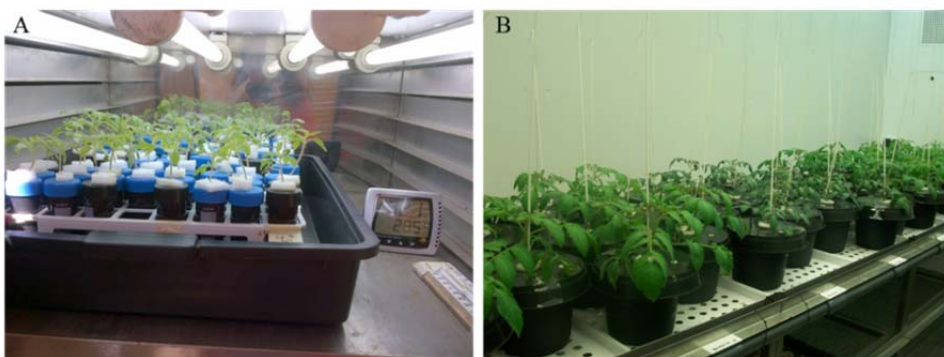


Figura 2.3. Interior de las cámaras de cultivo utilizadas para el cultivo de las plantas. (A) Cámara de cultivo tipo Fitotrón utilizada para el cultivo de las plantas a 21 DDG. (B) Cámara de altas prestaciones utilizada para el cultivo de las plantas a 40 DDG.

La determinación de la Lpr en plantas de mayor edad (40 DDG) sólo se llevó a cabo en los dos genotipos parentales. Al igual que en el caso anterior, una vez esterilizadas, las semillas germinadas se colocaron en tubos Falcon con solución nutritiva hasta desarrollar la primera hoja (en torno a 10 días de edad). En este estadio, se seleccionaron 9 plantas de cada genotipo para su cultivo hidropónico durante 1 mes. Las plantas se cultivaron individualmente en macetas de plástico, con 2,9 L de solución nutritiva Hoagland modificada para tomate (ver capítulo 1, Tabla 1.1, página 42) en continua aireación. Los valores de las variables ambientales en el interior de la cámara de cultivo fueron las mismas que las utilizadas para la evaluación del consumo de agua (ver capítulo 1, Figura 1.3, página 41) (Fig. 2.3B).

2.2.2. Determinación de la Lpr en plantas de 21 días de edad

La determinación de la Lpr se llevó a cabo en plantas de 21 días de edad y a primera hora de la mañana (tras el periodo de oscuridad) mediante la técnica de libre exudado descrita por Knipfer y Fricke (2010) (Fig. 2.4).



Figura 2.4. Estado de desarrollo de las plantas de los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y de las 13 líneas RILs seleccionadas antes de la medida de Lpr (21 DDG). Todas ellas presentaban los cotiledones, el primer par de hojas verdaderas y el ápice.

Tras eliminar la parte aérea de la planta (cortando 3-4 cm correspondientes al hipocótilo, por encima del comienzo de la raíz propiamente dicha) (Fig.2.5C), se procedió a la obtención de la tasa de flujo osmótico (Q) del sistema radicular completo. Para ello, el tallo de la planta se insertó en un tubo de silicona flexible (diámetro interno de 2 mm), que llevaba acoplado otro tubo flexible de silicona (diámetro interno de 1 mm) (Fig.2.5D), y se selló con pegamento (Loctite super glue 3[®]) para asegurar que no hubiera ninguna pérdida del exudado (Fig.2.5F). A continuación, por el tubo de silicona de menor diámetro se introduce un capilar de vidrio (diámetro interno de 0,58 mm) (Fig.2.5G). Una vez dispuesto todo el sistema horizontalmente, con la raíz sumergida en la solución nutritiva, cada 5 minutos se registró el avance del exudado en el interior del capilar durante un periodo máximo de 70 minutos hasta obtener 20 μ l de exudado (Fig.2.5H).

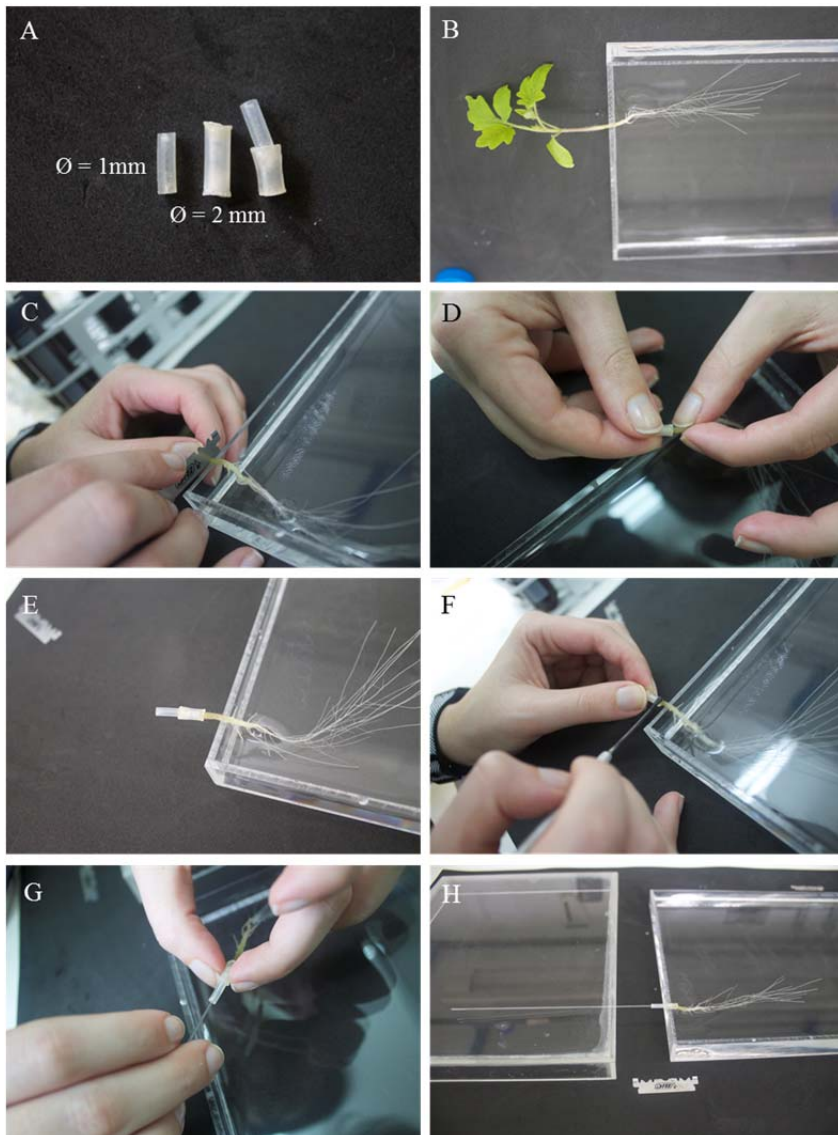


Figura 2.5. Medida de la tasa de flujo osmótico en un sistema radicular mediante la técnica de libre exudado en plantas de 21 días de edad. (A) Tubos de silicona flexible (B) Planta de 21 DDG antes de la medida de Lpr con la raíz sumergida en la solución nutritiva. (C) Eliminación de la parte aérea de la planta. (D) Colocación del tubo de silicona en el tallo de la planta. (E) Vista de la planta con los tubos de silicona acoplados. (F) Sellado del tubo de silicona a la planta mediante pegamento cianocrilato. (G) Inserción del capilar de vidrio en el tubo de silicona flexible de 1 mm de diámetro interior. (H) Raíz preparada para la medida de Lpr. La raíz se mantendrá en la solución nutritiva y el capilar de vidrio en horizontal.

El volumen del exudado (VE) en cada intervalo de tiempo se calculó a partir del radio del capilar de vidrio (r) y del incremento en la longitud de avance del exudado por el capilar (h) según la fórmula del volumen de un cilindro donde π es el número 3,1416:

$$VE = \pi \times r^2 \times h \quad (11)$$

La tasa de flujo del exudado libre (Q , $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) se calculó en la fase lineal (con una r^2 superior a 0,9 siendo en este caso de 0,99) a partir de las medias de los flujos en los distintos intervalos (Q_n) acorde al incremento de volumen de exudado ($VE_n - VE_{n-1}$) en un intervalo de tiempo determinado ($t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}}$) (Fig.2.6).

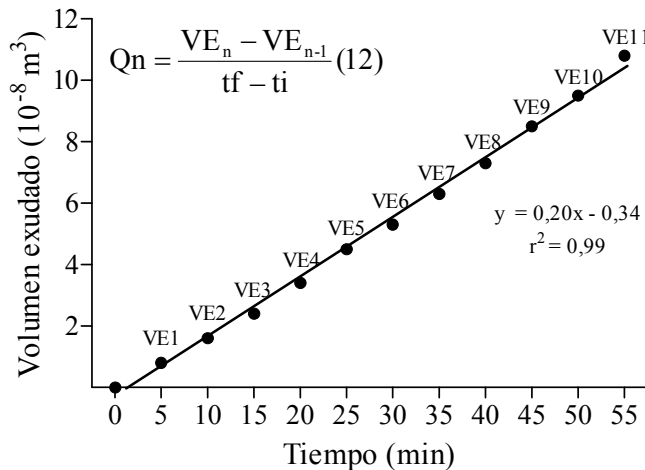


Figura 2.6. Evolución en el tiempo del volumen de savia producido por el exudado libre.

Tras el cálculo de la tasa de flujo por exudado libre (Q), para cada planta se determinó la presión osmótica en el exudado recogido y en una muestra de la solución nutritiva Hoagland que bañaba a la raíz correspondiente. Estas medidas se hicieron mediante el método de punto de congelación con un osmómetro (modelo Advanced Multimuestra 2020, Advanced Instruments, Needham Heights, MA). La diferencia entre el valor del potencial osmótico registrado en el exudado y el valor del potencial osmótico registrado en la solución nutritiva

que bañaba a la raíz es lo que determina el gradiente osmótico, también conocido como fuerza osmótica ($\Delta\pi = \pi$ en el exudado $- \pi$ en la solución nutritiva).

Realizadas estas medidas, se escanearon las raíces (Escáner Epson 1680, Epson America, Long Beach, Canada) en escala de grises y 400 dpi. Posteriormente, se eliminó el ruido de fondo tratando las imágenes con Adobe Photoshop (versión CS4, Adobe System). Estas imágenes se analizaron con el programa WinRhizo Pro (v. 2009, Regent Instruments, Québec, Canada) para obtener los valores de longitud y superficie total de cada una de las raíces, así como el porcentaje de longitud y superficie correspondiente a raíces finas (diámetro menor de 0,2 mm), raíces medias (diámetro entre 0,2 y 0,4 mm) y raíces gruesas (diámetro mayor de 0,4 mm). Por último se determinó el peso seco de las raíces después de un tiempo de secado de 48h a 65°C.

Utilizando las variables registradas la conductancia hidráulica (L_r , $\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$L_r = \frac{Q}{\sigma \times \Delta\Psi\pi} \quad (9)$$

Donde Q es la tasa de flujo del exudado libre ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), σ corresponde al coeficiente de reflexión de los solutos en las membranas y paredes celulares de la raíz (es adimensional y suele tomar el valor de 1) y $\Delta\Psi\pi$ es la fuerza osmótica (MPa) determinada por la diferencia de potencial osmótico entre el exudado y el medio que rodea a la raíz.

Finalmente, se calculó la conductividad hidráulica (L_{pr}) mediante la siguiente fórmula:

$$L_{pr} = L_r \times \frac{1}{D} \quad (10)$$

Donde D es la dimensión de la raíz (longitud, superficie o peso seco).

2.2.3. Determinación de la Lpr en plantas de 40 días de edad

La Lpr se determinó a primera hora de la mañana (tras el periodo de oscuridad) mediante pesada del volumen total de exudado (Carvajal *et al.*, 2000) en plantas de 40 días de edad. Para ello, se eliminó la parte aérea de la planta mediante un corte por debajo de los cotiledones. Inmediatamente, se colocó un tubo flexible de silicona en el tallo (diámetro interior de 0,8 - 1,5 cm), prestando especial cuidado en evitar pérdidas de exudado cubriendo con Parafilm® la parte interior de contacto entre el tubo de silicona y el tallo (Fig.2.7). Se descartó el exudado de los 15 primeros minutos para eliminar posibles contaminaciones procedentes del floema y restos de tejido al realizar el corte. Se recogió y pesó el volumen total de exudado que se produjo durante la siguiente hora, considerando que 1 g corresponde a 10^{-6} m^3 , se calculó la tasa de flujo de exudado libre (Q) mediante la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{\text{volumen exudado (m}^3\text{)}}{\text{tiempo (s)}} \quad (13)$$

Las medidas de potencial osmótico, dimensiones de la raíz, clasificación en las tres clases de diámetro así como el cálculo de Lr y Lpr, se realizaron del mismo modo ya descrito para las plantas de 21 días de edad.



Figura 2.7. Detalle del sistema usado para la recogida del exudado en plantas de 40 días de edad.

2.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático SPSS versión 18. Previamente a este análisis, se identificaron y eliminaron valores atípicos (extremos) obtenidos en las medidas mediante el análisis gráfico de diagramas de cajas simples. El conjunto final de datos se analizó mediante modelos lineales generalizados (GLM, del inglés *Generalized Linear Model*) utilizando la función de enlace y la distribución conveniente para cada caso. El post hoc aplicado fue la corrección de Bonferroni ($p < 0.05$).

2.3. Resultados

2.3.1. Lpr en plantas de 21 días de edad

Los volúmenes de exudado medidos en plantas de 21 días de desarrollo aumentaron de forma lineal con el tiempo en todos los genotipos analizados. No obstante, el tiempo requerido para obtener los 20 μl necesarios para llevar a cabo las medidas de potencial osmótico varió según el genotipo, siendo el mínimo de 35 minutos en el parental MM y el máximo de 70 minutos en la RIL 98. Este hecho hizo que las tasas de flujo calculadas (Q) en el rango lineal mostrasen una gran variación entre las distintas líneas. MM, RIL 59 y RIL 65 tuvieron valores de Q $\sim 3,5$ veces superiores a los calculados para las líneas RIL 121, 98 y 73. Por otro lado, el valor de Q registrado en el parental doméstico fue un 40% superior al registrado en el parental silvestre TO-937 (Fig. 2.8A).

Para calcular la Lr y la Lpr es necesario conocer el gradiente de potencial osmótico ($\Delta\pi$) entre el exudado de la raíz y el medio externo que la rodea. Dicho potencial en la solución nutritiva fue de $0,049 \pm 0,0002$ MPa, mientras que en el exudado de la raíz se registraron diferencias entre los distintos genotipos analizados. Como resultado, el $\Delta\pi$ mostró variaciones significativas entre los genotipos, siendo en torno a un 27% mayor en el parental silvestre TO-937 y en las líneas RIL 121, 2, 175, 38, 115 y 94 con respecto a la RIL 73 y al parental doméstico MM (Fig.2.8B).

Los valores de conductancia hidráulica de la raíz (Lr), también mostraron una alta variabilidad entre genotipos (Fig.2.8C). Se registraron diferencias de hasta aproximadamente un 87% entre los valores máximos obtenidos en el parental doméstico MM y la RIL 59 y los valores mínimos registrados en la RIL 121.

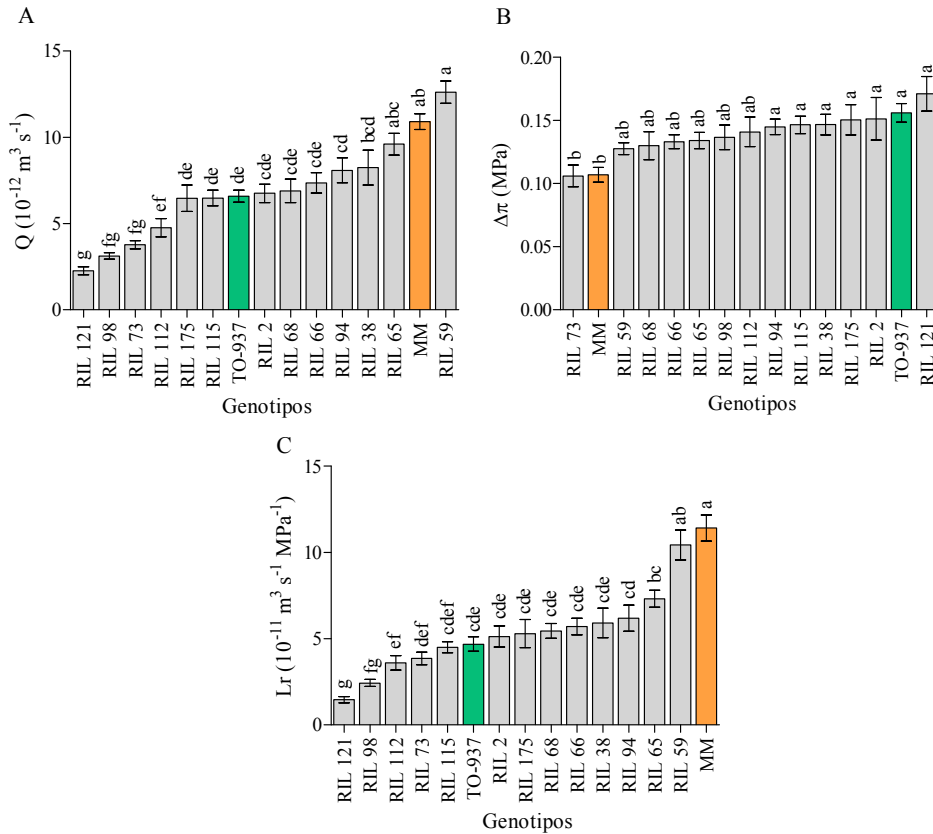


Figura 2.8. (A) Tasa de flujo de exudado libre, Q ; (B) gradiente de potencial osmótico registrado por diferencia entre los valores de potencial osmótico en el exudado y en la solución nutritiva que bañaba a las raíces, $\Delta\pi$; y (C) conductancia hidráulica del sistema radicular (L_r) obtenida en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las líneas 13 líneas RILs seleccionadas a los 21 DDG. Datos representados como media \pm SE ($n = 11-43$ plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

El desarrollo de la raíz de las plantas a los 21 DDG mostró una gran variabilidad entre genotipos (Fig.2.9), siendo significativas las diferencias registradas tanto en la longitud como en la superficie (Fig.2.10). La mayor longitud y superficie se registró en las raíces de la RIL 68, siendo sus valores más de un 40% superiores a los registrados en las raíces de la línea RIL 121. Con respecto a los genotipos parentales, no se encontraron diferencias significativas entre ellos, mostrando una longitud de $1,8 \pm 0,1$ m para TO-937 y

de $1,6 \pm 0,1$ m para MM y una superficie de $0,0014 \pm 0,0001$ m² para TO-937 y de $0,0013 \pm 0,0001$ m² para MM (Fig.2.10A/2.10B). Sin embargo, sí se registraron diferencias significativas entre los parentales y algunas de las RILs analizadas, presentando el parental silvestre TO-937 una longitud de raíz un 25% superior a la registrada en la RIL 121, mientras que el parental doméstico MM presentó una longitud un 29% menor que en la RIL 68 (Fig.2.10A). En relación a la superficie de la raíz, de nuevo la RIL 68 registró una superficie en torno a un 32% mayor que ambos parentales (Fig.2.10B).

El peso seco de la raíz también mostró una variabilidad, siendo el valor medio de la RIL 59 el doble del registrado en la RIL 121 (Fig.2.10C). Al igual que se observó en la longitud y superficie, los genotipos parentales no mostraron diferencias entre sí en el peso seco de raíz alcanzando este un valor de $6,0 \pm 0,4$ mg para TO-937 y de $5,5 \pm 0,3$ mg para MM. Estos valores de peso seco registrado en los genotipos parentales fueron inferiores a la mayoría de los valores de peso seco registrado en el conjunto de las líneas RILs evaluadas. Cabe destacar que la RIL 121 fue la que presentó los valores más bajos en todos los parámetros biométricos.

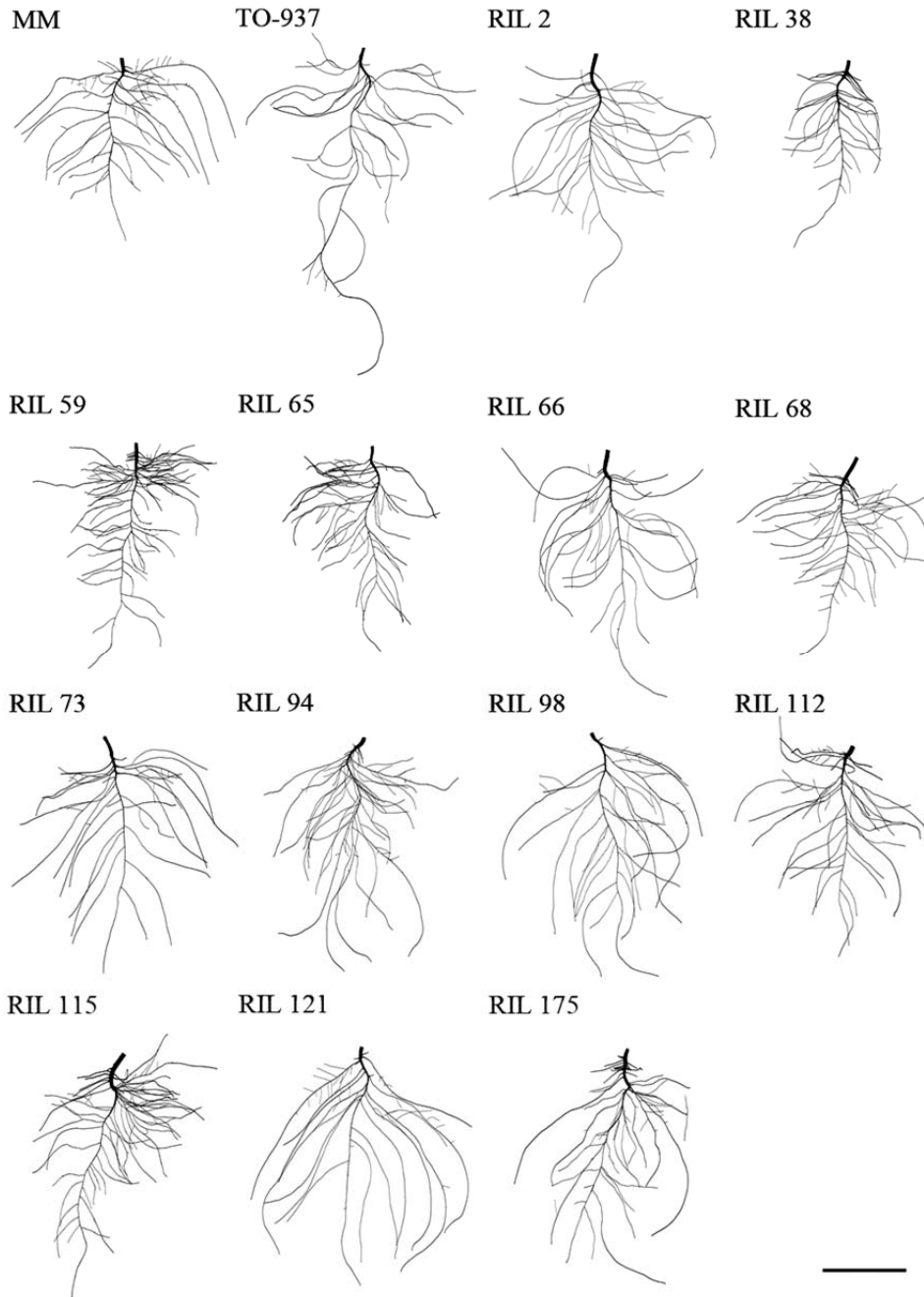


Figura 2.9. Imágenes representativas del desarrollo de las raíces a 21 DDG, en los dos genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (MM) y *Solanum pimpinellifolium* (TO-937) a 21 DDG y en las 13 líneas RILs derivadas de este cruce. Barra equivale a 5cm.

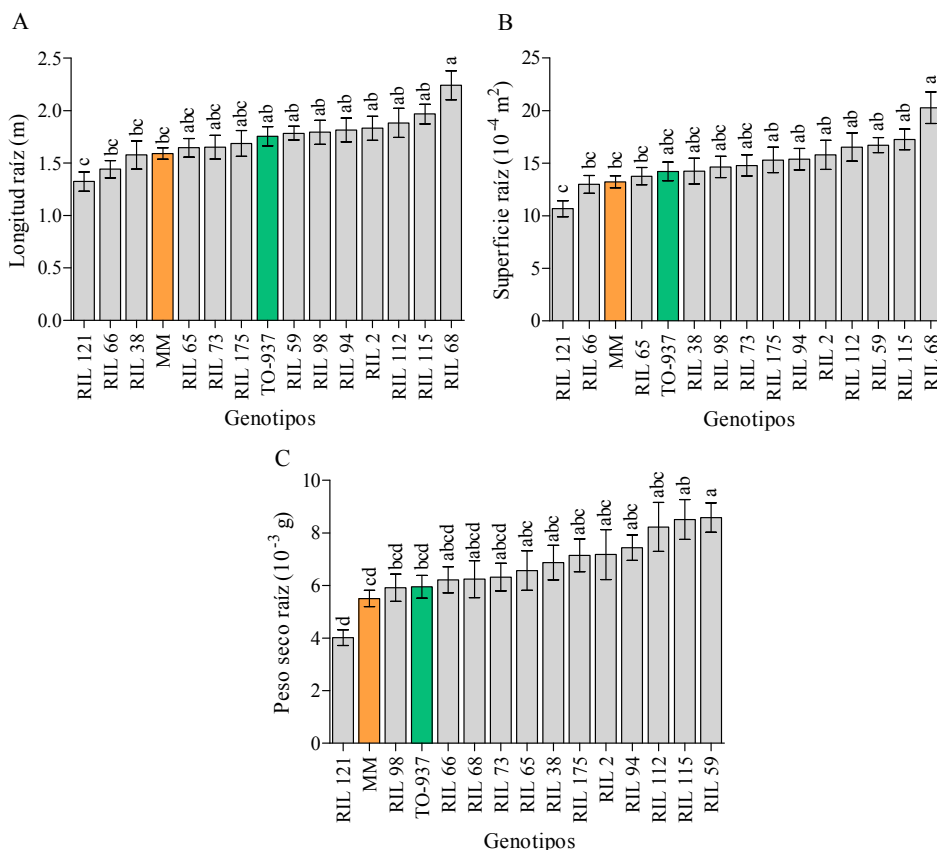


Figura 2.10. Parámetros biométricos de la raíz. (A) longitud, (B) superficie y (C) peso seco de la raíz en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a los 21 DDG. Datos representados como media \pm SE (n = 11-43 plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

Clasificación de la longitud y superficie de la raíz función de su diámetro

El análisis de las imágenes de las raíces digitalizadas con el programa WinRhizo PRO permitió clasificar la longitud y superficie total de la raíz en tres categorías de diámetro: raíces finas (diámetro menor de 0,2 mm), raíces de grosor medio (diámetro entre 0,2 y 0,4 mm) y raíces gruesas (diámetro mayor que 0,4 mm) (Tabla 2.3).

En relación a la longitud, en los dos genotipos parentales se observó una distribución similar de la longitud correspondiente a cada una de las tres categorías, con unos porcentajes promedio de distribución de alrededor de 59% de raíces finas, de 37% de raíces de grosor medio y de 4% de raíces gruesas. Por el contrario, sí se registraron diferencias significativas en esta distribución entre algunas líneas RILs. La RIL 68 presentó un ~36% más de raíces finas ($121,1 \pm 9,4 \times 10^{-2}$ m) con respecto a la RIL 66 y 175 ($75,3 \pm 3,8 \times 10^{-2}$ m y $80,2 \pm 5,9 \times 10^{-2}$ m, respectivamente). Por otro lado, la mayor longitud de raíces de grosor medio se registró en las líneas RILs 68, 115, 175 y 59 alcanzando valores medios en torno a un 45% superiores al observado en la RIL 121. Por último, la mayor longitud en raíces gruesas se observó en las líneas RILs 68 y 59, siendo este valor aproximadamente un 70% superior al registrado en la línea RIL 121 y aproximadamente el doble al registrado en los genotipos parentales y en las RILs 98, 73, 94, 66, 65, 115 y 175 (Tabla 2.2).

En relación a la superficie, tampoco se registró una diferencia significativa en la superficie de raíces finas, medias y gruesas entre los genotipos parentales (alrededor de un 41%, 46% y 13% respectivamente). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre algunas líneas RILs. La mayor superficie de raíces finas se registró en las RILs 68 y 94, alcanzando valores ~1,4 veces superiores a los registrados en las RILs 66, 38 y 175. En relación a la superficie de raíces medias, fueron las líneas RILs 68, 115, 175 y 59 las que presentaron los mayores valores, siendo éstos ~1,9 veces superiores al registrado en la RIL 121. Por último, en la RIL 68 se observó la mayor superficie de raíces gruesas alcanzando valores ~1,9 veces superiores a los registrados en los genotipos parentales y en 6 líneas RILs (RILs 66, 175, 94, 73, 65 y 98) y 3,3 veces superiores al registrado en RIL 121 (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Distribución de la longitud (m) y de la superficie (m²) de raíz en tres categorías: raíces finas (diámetro menor de 0,2 mm), raíces de grosor medio (diámetro entre 0,2 y 0,4 mm) y raíces gruesas (diámetro mayor de 0,4 mm). Los datos se obtuvieron de raíces de plantas de 21 días de edad, correspondientes a los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y las 13 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE (n = 11-43 plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

Genotipos	Longitud (10 ⁻² m)			Superficie (10 ⁻⁴ m ²)		
	Raíces Finas	Raíces Medias	Raíces Gruesas	Raíces Finas	Raíces Medias	Raíces Gruesas
MM	92 \pm 6 ^{abc}	61 \pm 5 ^{ab}	5 \pm 0 ^{bc}	5,3 \pm 0,3 ^{abc}	6,1 \pm 0,5 ^{ab}	1,8 \pm 0,1 ^d
TO-937	105 \pm 5 ^{ab}	64 \pm 5 ^{ab}	5 \pm 1 ^b	6,0 \pm 0,3 ^{abc}	6,3 \pm 0,5 ^{ab}	1,9 \pm 0,2 ^{cd}
RIL 2	111 \pm 7 ^{ab}	64 \pm 10 ^{ab}	10 \pm 2 ^{ab}	6,7 \pm 0,4 ^{ab}	6,3 \pm 1,0 ^{ab}	2,8 \pm 0,4 ^{abc}
RIL 38	80 \pm 8 ^{abc}	70 \pm 8 ^{ab}	8 \pm 1 ^{ab}	5,0 \pm 0,4 ^{bc}	6,8 \pm 0,8 ^a	2,5 \pm 0,2 ^{abcd}
RIL 59	89 \pm 5 ^{abc}	79 \pm 5 ^a	5 \pm 1 ^a	5,4 \pm 0,3 ^{abc}	8,1 \pm 0,5 ^a	3,2 \pm 0,3 ^{ab}
RIL 65	103 \pm 5 ^{abc}	55 \pm 5 ^{ab}	5 \pm 1 ^{bc}	6,4 \pm 0,3 ^{abc}	5,4 \pm 0,5 ^{ab}	1,9 \pm 0,2 ^{cd}
RIL 66	75 \pm 4 ^c	63 \pm 6 ^{ab}	6 \pm 1 ^{bc}	4,6 \pm 0,2 ^c	6,1 \pm 0,6 ^{ab}	2,3 \pm 0,6 ^{bcd}
RIL 68	121 \pm 9 ^a	91 \pm 8 ^a	8 \pm 3 ^a	7,4 \pm 0,6 ^a	9,1 \pm 0,9 ^a	3,8 \pm 0,6 ^a
RIL 73	81 \pm 8 ^{bc}	79 \pm 6 ^{ab}	6 \pm 1 ^{bc}	5,1 \pm 0,5 ^{abc}	7,7 \pm 0,6 ^{ab}	2,0 \pm 0,2 ^{cd}
RIL 94	108 \pm 7 ^{ab}	67 \pm 6 ^{ab}	6 \pm 1 ^{bc}	6,8 \pm 0,4 ^a	6,6 \pm 0,6 ^{ab}	2,1 \pm 0,2 ^{cd}
RIL 98	105 \pm 7 ^{abc}	70 \pm 8 ^{ab}	8 \pm 0 ^{bc}	6,3 \pm 0,4 ^{abc}	6,7 \pm 0,8 ^{ab}	1,6 \pm 0,1 ^{de}
RIL 112	103 \pm 7 ^{abc}	79 \pm 9 ^a	9 \pm 1 ^{ab}	6,5 \pm 0,4 ^{abc}	7,7 \pm 0,9 ^{ab}	2,4 \pm 0,3 ^{abcd}
RIL 115	101 \pm 6 ^{abc}	89 \pm 8 ^a	8 \pm 1 ^{bc}	6,3 \pm 0,4 ^{abc}	8,7 \pm 0,8 ^a	2,3 \pm 0,3 ^{abcd}
RIL 121	82 \pm 6 ^{abc}	47 \pm 5 ^b	5 \pm 0 ^c	5,0 \pm 0,3 ^{abc}	4,5 \pm 0,4 ^b	1,1 \pm 0,1 ^e
RIL 175	80 \pm 6 ^{bc}	82 \pm 8 ^a	8 \pm 1 ^b	5,0 \pm 0,4 ^{bc}	8,2 \pm 0,9 ^a	2,2 \pm 0,2 ^{bcd}

Los valores de conductividad hidráulica (Lpr) calculados en base a la longitud (Fig.2.11A), a la superficie (Fig.2.11B) y al peso seco de la raíz (Fig.2.11C), en plantas de 21 días de edad, muestran una gran variabilidad entre los distintos genotipos. En el parental doméstico MM se registraron los mayores valores de Lpr, ($7,3 \pm 0,5 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ [calculado en base a la longitud de la raíz], de $9,1 \pm 0,6 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ [calculado en base a la superficie de la raíz] y de $22,5 \pm 2,2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1} \text{ g}^{-1}$ [calculado en base al peso seco de la raíz]), mientras que la RIL 121 fue la línea que presentó los valores de Lpr más bajos. Independientemente del parámetro biométrico utilizado para calcular la

Lpr, de forma general se mantuvieron las diferencias entre los genotipos parentales y entre éstos y las líneas RILs. El parental doméstico MM presentó un valor medio de Lpr un 59% mayor con respecto al valor registrado en el parental silvestre TO-937 y en torno a un 80% mayor con respecto a los valores de Lpr registrados en las líneas que presentaron los menores valores de Lpr (RIL 121 y 98).

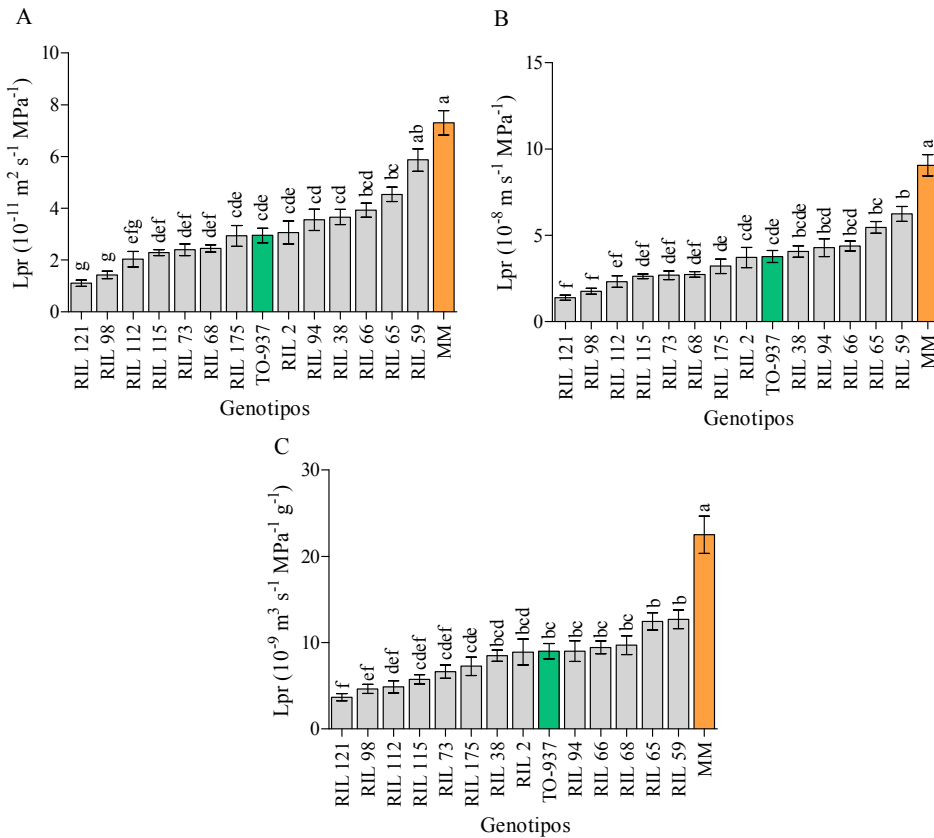


Figura 2.11. Conductividad hidráulica del sistema radicular (Lpr) calculado en base a (A) la longitud, (B) a la superficie y (C) al peso seco de la raíz en los genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas, en plantas de 21 DDG. Datos representados como media \pm SE (n = 11-43 plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

2.3.2. Lpr en plantas de 40 días de edad

La tasa de flujo de exudado libre (Q) registrada en las plantas de 40 DDG fue en MM un 45% superior a la registrada en TO-937 (Fig.2.12A). El potencial osmótico de la solución nutritiva presentó un valor medio de $0,085 \pm 0,001$ MPa mientras que en el exudado el valor fue un 19% superior en TO-937 con respecto a MM ($0,180 \pm 0,004$ en TO-937 y $0,145 \pm 0,002$ en MM). Como consecuencia, el gradiente de potencial osmótico ($\Delta\pi$) en TO-937 fue 1,5 veces superior al del parental doméstico MM (Fig.2.12B). La conductancia hidráulica (Lr) calculada a partir de Q y $\Delta\pi$ mostró valores de $13,2 \pm 2,1$ y $5,0 \pm 0,7$ para MM y TO-937, respectivamente, lo que supuso una diferencia del 62% entre los genotipos parentales (Fig.2.12C).

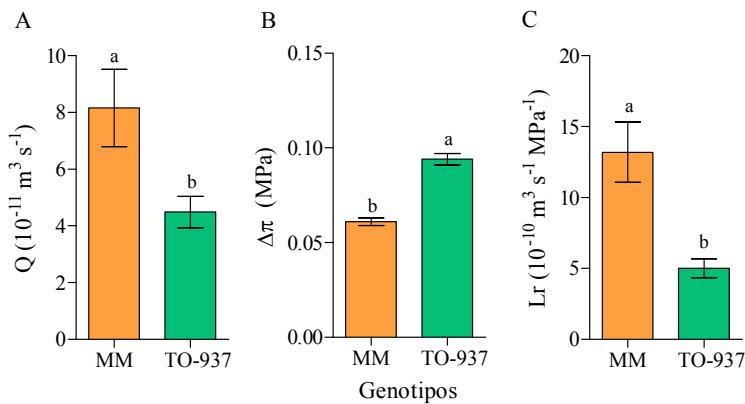


Figura 2.12. (A) Tasa de flujo de exudado libre, Q; (B) gradiente de potencial osmótico, $\Delta\pi$; y (C) conductancia hidráulica del sistema radicular (Lr) registrado en los genotipos parentales de la población RIL, en plantas de 40 DDG. Datos representados como media \pm SE (n = 9 plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

Con respecto a los parámetros biométricos de la raíz, el análisis de las imágenes escaneadas (Fig.2.13A) mostró que no existían diferencias significativas entre los genotipos parentales en cuanto a la longitud y superficie total de la raíz, presentando unos valores de $18,7 \pm 1,2$ m y $0,018 \pm 0,001 \text{ m}^2$, respectivamente para TO-937 y de $17,6 \pm 1,2$ m y $0,016 \pm 0,002 \text{ m}^2$, respectivamente para MM (Fig.2.13B/Fig.2.13C). Sin embargo, sí se observó

una arquitectura diferente entre el parental doméstico MM y el silvestre TO-937. MM presentaba un sistema radicular muy ramificado con raíces secundarias, terciarias e incluso de cuarto orden en la parte basal de la raíz, mientras que TO-937 presentaba un sistema radicular menos ramificado con raíces secundarias de mayor longitud a las registradas en MM.

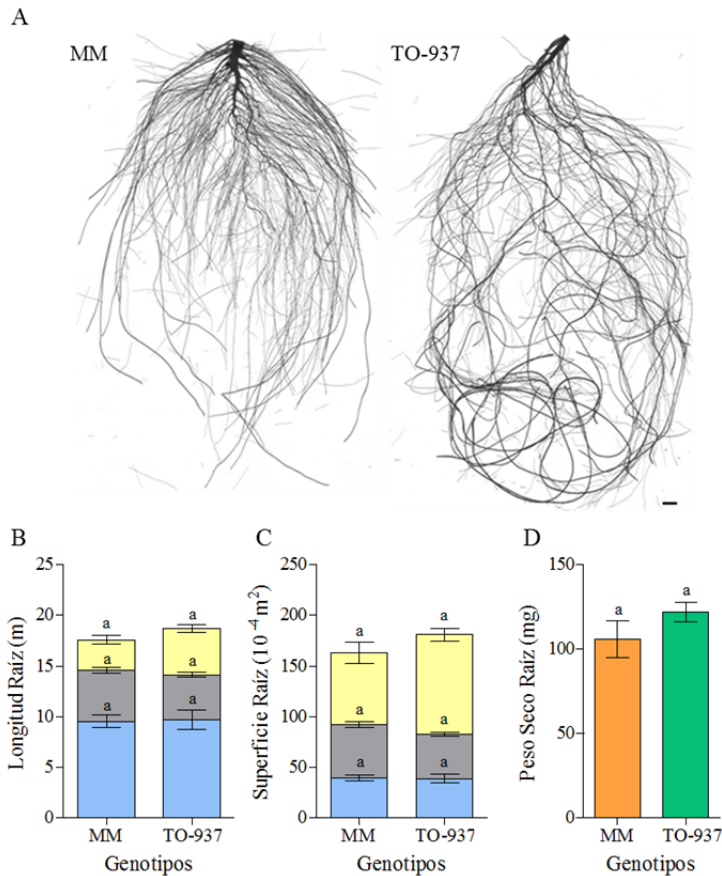


Figura 2.13. (A) Imágenes representativas del estado de desarrollo de la raíz de MM y de TO-937 en plantas de 40 DDG. Parámetros biométricos de la raíz: (B) longitud y (C) superficie con su correspondiente reparto según el diámetro de la raíz: ■ raíces finas (diámetro ≤ 0,2 mm); ■ raíces medias (diámetro de 0,2 a 0,4 mm); y ■ raíces gruesas (diámetro ≥ 0,4 mm). (D) Peso seco de la raíz. Datos representados como media ± SE (n = 9 plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni). Barra equivale a 1 cm.

No se observaron diferencias significativas en el reparto de la longitud entre las tres categorías de diámetro de la raíz, presentando una proporción media de

un 53% de raíces finas (diámetro menor que 0,2 mm), un 27% de raíces de grosor medio (diámetro entre 0,2 y 0,4 mm) y un 21% de raíces gruesas (diámetro mayor que 0,4 mm) (Fig.2.13B). Tampoco se registró una diferencia significativa en la superficie de raíces finas, medias y gruesas entre los parentales, presentando un 23%, un 28% y un 49%, respectivamente (Fig.2.13C). En cuanto al peso seco de las raíces no se observaron diferencias significativas entre los parentales, obteniendo un peso medio de 114 ± 6 mg (Fig.2.13D).

Se calculó la conductividad hidráulica (Lpr) en base a la longitud (Fig.2.14A), a la superficie (Fig.2.14B), y al peso seco de la raíz (Fig.2.14C). De nuevo, el parental doméstico MM mostró los mayores valores, con una Lpr de $11,1 \pm 0,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (calculada en base a la longitud de la raíz), una Lpr de $12,4 \pm 0,6 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (calculada en base a la superficie de la raíz) y una Lpr de $21,1 \pm 0,9 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (calculada en base al peso seco de la raíz). En los tres casos, la Lpr obtenida en MM fue 3 veces superior a la obtenida en TO-937.

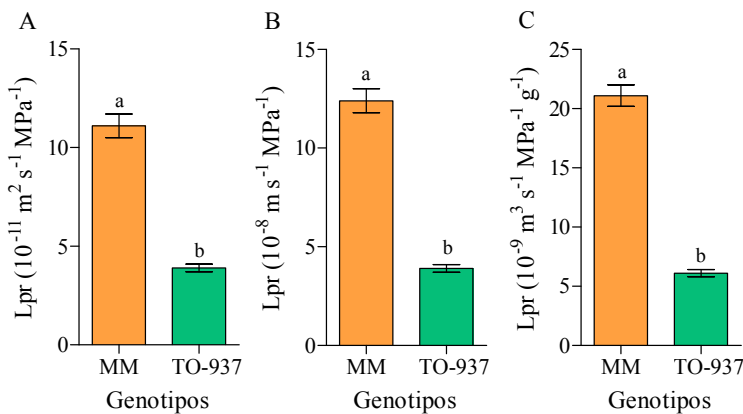


Figura 2.14. Conductividad hidráulica del sistema radicular (Lpr) calculado en base a (A) la longitud, (B) a la superficie, y (C) al peso seco de la raíz registrado en los genotipos parentales de la población RIL, en plantas de 40 DDG. Datos representados como media \pm SE (n = 9 plantas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

2.4. Discusión

Se observó una gran variabilidad en los valores de Lpr entre las distintas líneas, registrándose diferencias de más del 80% entre algunas de ellas (Fig.2.11). En algunas líneas, estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad registrada en el desarrollo del sistema radicular (Fig.2.10). Por ejemplo, la RIL 59, que presentó un sistema radicular con unos valores de longitud, superficie y peso seco superiores en más de un 25% a los registrados en la RIL 121, presentó un valor de Lpr superior en un 75% al de dicha RIL. Este tipo de resultados pone de manifiesto que un mayor desarrollo del sistema radicular puede proporcionar una mayor capacidad de absorción de agua por parte del mismo (Orians y Solbrig, 1977; Suku *et al.*, 2014). No obstante, hubo genotipos que a pesar de no presentar diferencias significativas de longitud, superficie o peso seco de la raíz, registraron valores de Lpr significativamente diferentes. De este modo, el parental doméstico MM presentó un valor de Lpr 2,3 veces superior al de TO-937 sin que hubiera diferencias en los parámetros mencionados. Por otro lado, no siempre diferencias en el desarrollo radicular determinaron diferencias en la Lpr. Así, las RILs 115 y 121 que presentaron diferencias significativas en el desarrollo del sistema radicular (1,7 veces superior en la RIL 115), registraron valores de Lpr similares. Por tanto, de estos resultados se puede concluir que la variabilidad existente en los parámetros de longitud, superficie y peso seco de la raíz, fueron insuficientes para explicar las grandes diferencias encontradas en los valores de Lpr y que debe de haber otros factores implicados.

De los datos que se pueden encontrar en la bibliografía sobre la Lpr muchos se han calculado en base al peso seco de la raíz (Carvajal *et al.*, 2000; Aroca *et al.*, 2003; Martínez-Ballesta *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2007). Dado que desde un punto de vista funcional la longitud y/o la superficie determinan el contacto con el medio, en el presente trabajo se quiso comparar los valores de Lpr en base a estos 3 indicadores del desarrollo del sistema

radicular. De forma general, los resultados mostraron que el tipo de parámetro biométrico usado para el cálculo de la Lpr no modifica las diferencias encontradas en este parámetro (Fig.2.11). Por ejemplo, el parental doméstico MM presentó una Lpr en torno a 2,5 veces superior al parental silvestre TO-937 y a la RIL 2 sin importar si el valor de Lpr fue calculado en base a la longitud o a la superficie. Sin embargo cuando la Lpr se calculó en base al peso seco de la raíz, hubo líneas en las que la proporción con respecto al parental doméstico varió con valores entre aproximadamente un 20% mayor (RILs 38 y 59) y un 30% menor (RIL 68). Estos resultados ponen de manifiesto que es aconsejable calcular la Lpr en base a la longitud y a la superficie, siendo la superficie más adecuada ya que tiene en cuenta el diámetro de la raíz, y por tanto siendo más representativa de la resistencia radial que puede limitar el flujo del agua (Suku *et al.*, 2014). Por el contrario, la Lpr calculada en base al peso seco de la raíz debiera utilizarse únicamente cuando no exista posibilidad de obtener las medidas de superficie o longitud de una manera precisa.

El diámetro de la raíz es un parámetro importante en la absorción de agua y en algunos trabajos desarrollados en plantas herbáceas se ha mostrado que es inversamente proporcional a la Lpr (Hummel *et al.*, 2007). En especies leñosas como el álamo se ha observado que las raíces finas tienen un papel muy relevante en la captación del agua (Xi *et al.*, 2013), y en cítricos se ha determinado que las raíces gruesas están menos implicadas en esta función (Eissenstat, 1992). A pesar de que los genotipos evaluados en el presente trabajo mostraron variabilidad en la longitud y superficie de raíces finas y gruesas (Tabla 2.2), los resultados no fueron del todo consistentes con esta teoría. Por un lado, se observaron líneas, como la RIL 68 y 2, que presentaron los valores más altos de longitud y/o superficie de raíces finas y sin embargo no fueron los que presentaron los mayores valores de Lpr. Por otro lado, líneas con alta longitud y superficie de raíces gruesas (como la línea RIL 59) mostraron valores elevados de Lpr. Además, genotipos que no presentaron diferencias significativas en

relación a la superficie y longitud de raíces finas y gruesas, como los parentales, mostraron diferencias significativas en la Lpr.

El gradiente de potencial osmótico causante de la presión radicular positiva según el «*modelo compuesto del transporte radial de agua*», sería la fuerza motriz que promueve el movimiento de agua desde el medio que rodea a la raíz hacia el interior de los vasos xilemáticos (Steudle y Peterson, 1998). Sin embargo, los datos registrados muestran que un mayor gradiente osmótico no siempre se corresponde con una mayor Lpr. Así en la línea RIL 121 y el parental TO-937 que presentaron los valores más altos del gradiente de potencial osmótico (Fig.2.8B), no se registraron los valores más elevados de Lpr. Por tanto, cabe considerar que al menos en estos genotipos, el mayor gradiente osmótico es consecuencia de una mayor concentración de sales en el xilema. Estos resultados sugieren que otros factores como los co-transportadores KCC, que como ya se comentó en la introducción de este capítulo son capaces de co-transportar iones y agua hacia el interior del xilema (Kong *et al.*, 2011), podrían estar contribuyendo a las diferencias registradas en la Lpr (Wegner, 2014).

Los valores de conductividad hidráulica (Lpr) pueden variar con la edad de la planta (Huang y Nobel, 1993) disminuyendo, como consecuencia de los procesos de suberización y maduración de los vasos xilemáticos (Huang y Eissenstat, 2000) o aumentando, a causa de una mayor actividad de las acuaporinas (Chaumont y Tyerman, 2014). Otros autores proponen que la Lpr puede mantenerse constante a lo largo del desarrollo si el sistema radicular es capaz de absorber agua de manera uniforme a lo largo de toda la longitud de sus raíces. Así, aumentando dicha longitud, aumentaría la conductancia hidráulica (Lr) mientras que la conductividad hidráulica (Lpr) permanecería estable (Bramley *et al.*, 2009). Los datos obtenidos en el presente trabajo confirman este hecho: los valores registrados en los genotipos parentales en dos estadios de crecimiento (21 DDG y 40 DDG) mostraron un incremento de la biomasa del

sistema radicular del 90%, lo que conllevó un incremento de la Lr manteniendo constantes los valores de Lpr.

A pesar de los pocos estudios enfocados al análisis de Lpr en plantas de tomate, no existe una concordancia en los resultados ya que los valores de Lpr mostrados en este capítulo, obtenidos por el método de libre exudado, fueron inferiores a los registrados por Maggio y Joly (1995) y superiores a los mostrados por Fernández-García *et al.* (2002), ambos obtenidos por el método de cámara de presión. Las diferencias encontradas podrían deberse a los diferentes métodos utilizados para obtener los valores de Lpr (Knipfer *et al.*, 2007). Mediante el método de cámara de presión, la presión ejercida puede forzar el transporte de agua a través del apoplasto y de los espacios intercelulares, pudiendo disminuir la resistencia radial y por tanto aumentando los valores de Lpr (Suku *et al.*, 2014). Por otro lado, este método puede inducir flujos de agua que superan, por varios órdenes de magnitud, a los valores causados por la transpiración (Knipfer, 2010). Como consecuencia se puede producir una acumulación de solutos en el medio que rodea a la raíz, lo que disminuiría el gradiente de potencial osmótico entre los vasos xilemáticos de la raíz y el medio externo, o procesos de cavitación en el xilema. Ambos tipos de respuesta pueden dar lugar a una subestimación en los valores de Lpr (Kolb *et al.*, 1996; Knipfer, 2010). Por último, la aplicación de una presión positiva externa no permite determinar la capacidad de captación de agua de forma activa por parte del sistema radicular, algo que sí es posible determinar con el método de libre exudado.

En conclusión, la puesta a punto del método de libre exudado para determinar la Lpr en raíces de plantas de tomate de 21DDG y su aplicación en la determinación de dicho parámetro, han permitido obtener unos resultados que muestran una gran variabilidad en los valores de Lpr registrados en los dos genotipos parentales y en las 13 líneas RILs evaluadas. Sin embargo, ni las diferencias registradas en la longitud y superficie de las raíces, ni la proporción

de raíces finas, medias o gruesas, son suficientes para explicar la alta variabilidad encontrada en Lpr. El análisis de los datos desvela que la Lpr es un parámetro complejo que requiere de un estudio más pormenorizado del sistema radicular. Cambios en la anatomía y/o morfología de la raíz (Steudle y Peterson, 1998; Hummel *et al.*, 2007), diferencias en la expresión de acuaporinas (proteínas de membrana implicadas principalmente en el flujo del agua (Maurel, 1997; Tyerman *et al.*, 1999)) o diferencias en la deposición y/o composición de barreras apoplásticas en forma de depósitos de suberina en la matriz de la pared celular (Schreiber *et al.*, 1999), podrían estar implicadas en las diferencias de Lpr registrada entre RILs. Por ello, se abordó el estudio de algunos de estos factores cuyos resultados se presentan en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO 3

ARQUITECTURA Y ANATOMÍA INTERNA DE LA RAÍZ DE TOMATE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3.1. Introducción

Numerosos trabajos confirman la estrecha relación que existe entre la **arquitectura de la raíz** y la productividad (Landi *et al.*, 2001; Tuberosa *et al.*, 2002; Manschadi *et al.*, 2006; Steele *et al.*, 2007; Wasson *et al.*, 2012; Comas *et al.*, 2013; Lobet *et al.*, 2014). Esta arquitectura está determinada por el número de raíces primarias, secundarias, etc., su longitud y distribución en las 3 direcciones del espacio. Todo ello delimita la capacidad del sistema radicular de un determinado genotipo para explorar el suelo, y por tanto establece los límites de volumen de agua potencialmente accesibles por el mismo (Landi *et al.*, 2010; Wasson *et al.*, 2012; Comas *et al.*, 2013; Lynch, 2013; Lobet *et al.*, 2014). Con respecto a la productividad también se ha demostrado que está relacionada con una menor resistencia en el transporte radial y axial del agua en la raíz. La resistencia a dicho flujo radial, entre otros aspectos, depende del grosor del córtex, mientras que el número de vasos del xilema y su calibre son los principales aspectos que condicionan el flujo axial de savia hacia la parte aérea de las plantas (Uga *et al.*, 2008; Tombesi *et al.*, 2010).

El análisis funcional de la arquitectura y anatomía de la raíz en relación a la captura de agua y nutrientes, ha sido ampliamente estudiado en *Arabidopsis* y en algunos cultivos de cereales como trigo, arroz o maíz (Zimmermann *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Armengaud *et al.*, 2009; Bramley *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2010; Palta *et al.*, 2011), pero del que apenas hay información para el cultivo de tomate (Ron *et al.*, 2013). Además, dicha información es incompleta y en ocasiones contradictoria. Esto se debe a que a pesar de que los caracteres que condicionan la morfo-arquitectura del sistema radicular están gobernados genéticamente (Hochholdinger *et al.*, 2004; de Dorlodot *et al.*, 2007; Hodge *et al.*, 2009), existe una elevada plasticidad de los mismos frente a factores ambientales (Osmond *et al.*, 2007; Monzón *et al.*, 2012; Comas *et al.*, 2013).

3.1.1. Arquitectura del sistema radicular

La arquitectura del sistema radicular hace referencia a la configuración espacial que presentan las raíces de edad y orden diferentes, así como a la tasa de elongación de dichas raíces, la cual determina su longitud total (Werner *et al.*, 2010; Rich y Watt, 2013). Este término engloba a la morfología, haciendo referencia a las características superficiales de la raíz (diámetro de la raíz, presencia o no de pelos radiculares o patrón de aparición de las raíces laterales) y la topología, referida a la conexión entre los distintos ejes de la raíz (ramificación de la raíz) (Lynch, 1995). La arquitectura de la raíz es fundamental para la asimilación de los recursos presentes en el medio de cultivo, ya que determina su capacidad para explorar un determinado volumen de sustrato (Fitter, 2002).

En la etapa inicial del crecimiento, las plantas dicotiledóneas, como el tomate o *Arabidopsis*, presentan un **sistema radicular alorrido o pivotante** (Fig.3.1) compuesto únicamente por la raíz primaria y las raíces laterales (Esau, 1967). Existe una dominancia apical que adquiere la raíz primaria, a partir de la cual se desarrollan las raíces laterales secundarias de origen post-embriionario, que se forman desde el periciclo de la raíz primaria, generalmente adyacente a los polos xilemáticos (Casero *et al.*, 1995; Casimiro *et al.*, 2001). Estas raíces laterales secundarias pueden formar raíces laterales de mayor orden: raíces laterales terciarias (cuando se producen a partir de las secundarias), cuaternarias (cuando se producen a partir de las terciarias), y así sucesivamente. Cuando el sistema radicular está más desarrollado emergen las raíces adventicias desde el hipocótilo, epicótilo y/o el tallo (Osmont *et al.*, 2007) que pueden ser inducidas de forma natural (como una adaptación a los cambios ambientales) o de forma artificial (mediante la aplicación de hormonas) (Visser *et al.*, 1996; Ahkami *et al.*, 2009).

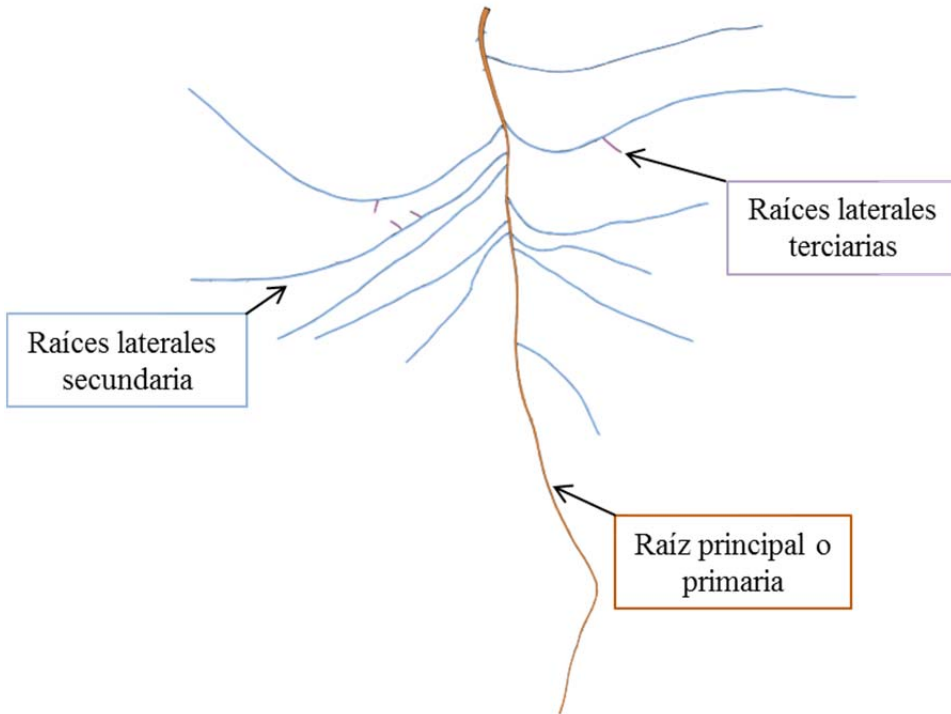


Figura 3.1. Arquitectura del sistema radicular de tomate a los 14 días después de la germinación. En este estadio de desarrollo la raíz de tomate es de tipo alorrizo o pivotante.

3.1.2. Anatomía interna de la raíz

Aunque la anatomía interna de la raíz difiere según la especie estudiada, existen elementos comunes a todas ellas. De forma general, en plantas dicotiledóneas, como el tomate, al observar un corte transversal pueden distinguirse las capas celulares que se detallan en la figura 3.2.

La **epidermis** consiste en una única capa de células en contacto directo con el medio exterior. A partir de algunas células epidérmicas, denominadas tricoblastos, se desarrollan los **pelos radiculares**, cuya principal función es la de incrementar la superficie de absorción de agua y nutrientes y la del volumen de suelo al que la raíz es capaz de acceder (Gilroy y Jones, 2000; Bibikova y Gilroy, 2002). La cantidad y longitud de dichos pelos dependerá de la especie y de las condiciones ambientales (Bramley, 2006). Algunas especies pueden

desarrollar una capa sub-epidérmica denominada **exodermis**. En esta capa se localizan las bandas de Caspary, depositadas en las paredes primarias anticlinales radiales de las células exodérmicas (Perumalla *et al.*, 1990; Schreiber, 1996; Hose *et al.*, 2001). Además, también presentan paredes celulares secundarias suberificadas (Perumalla *et al.*, 1990). Se piensa que la función principal de la exodermis, es similar a la de la endodermis, ejercer un control sobre el flujo de agua, pero en este caso entre el medio externo y el córtex. Este **córtex** está formado por un número variable de capas celulares dispuestas en serie. Debido a que las paredes celulares ejercen una resistencia al flujo del agua (Peterson y Steudle, 1993), el número de capas celulares que conformen el córtex puede afectar su transporte radial (Wasson *et al.*, 2012; Comas *et al.*, 2013).

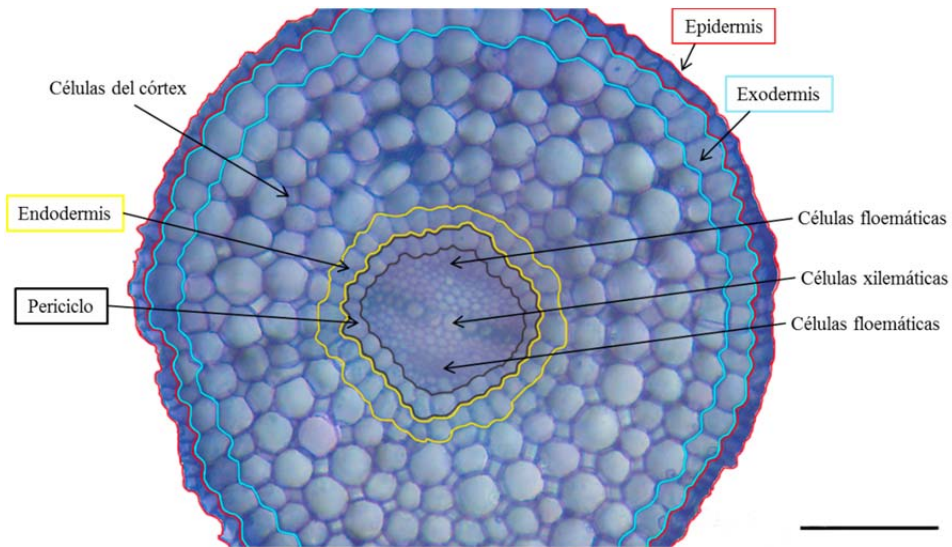


Figura 3.2. Sección transversal de una raíz de tomate en la que se detallan las diferentes capas celulares. Corte realizado a mano alzada (~0,3 mm de grosor) a 15 mm del ápice y teñido con Azul de toluidina 0,5% (p/v) y posterior visualización con un microscopio de campo claro (10x). Barra equivale a 100 μm .

La **endodermis** está formada por una única capa celular que separa el córtex del cilindro vascular (Peterson, 1992; Enstone *et al.*, 2003; Lux *et al.*, 2004) y cuya función principal es la de controlar el movimiento de agua y nutrientes

desde el córtex hacia el interior del anillo vascular (Steudle y Peterson, 1998). Sin embargo, algunos estudios muestran que bajo condiciones de sequía, puede tener lugar un movimiento de agua desde el anillo vascular hacia el medio exterior. Esto indica la existencia de un flujo bidireccional de agua que podría estar mediado por canales de agua (acuaporinas) localizados en esta capa celular (Bramley *et al.*, 2007). Al igual que la exodermis, la endodermis también presenta bandas de Caspary en las paredes anticlinales radiales de sus células cuya función fundamental es evitar el movimiento de iones, vía apoplasto, desde el córtex hacia el interior del anillo central y viceversa (Peterson *et al.*, 1993; Enstone *et al.*, 2003; Pfister *et al.*, 2014). Durante el crecimiento de la raíz, la endodermis sufre cambios en la composición química de sus paredes celulares, distinguiéndose tres estados de desarrollo (Enstone *et al.*, 2003): **1.** Endodermis primaria con presencia de bandas de Caspary en las paredes celulares. **2.** Endodermis secundaria con impregnaciones de suberina (*suberin lamellae*) y lignina en menor medida (Zeier *et al.*, 1999) alrededor de la célula, que ejercen un gran efecto sobre el movimiento del agua ya que fuerza dicho movimiento a través de los plasmodesmos (Geldner, 2013a; Robbins *et al.*, 2014). **3.** Endodermis terciaria con deposiciones adicionales de celulosa y lignina sobre la *suberin lamellae*. Esta endodermis terciaria, que suele carecer de suberina, se desarrolla principalmente en la mayoría de las monocotiledóneas y en algunas dicotiledóneas (Ma y Peterson, 2003). En este estadio de desarrollo terciario, las paredes celulares endodérmicas suelen describirse como «en forma de U» debido a que la pared periclinal interna (hacia el cilindro vascular) y la pared anticlinal radial están engrosadas, mientras que la pared periclinal exterior (hacia el córtex) permanece delgada (Geldner, 2013b). Al igual que en la exodermis, la endodermis puede presentar células de paso, generalmente cercanas a los polos del protoxilema que facilitan el flujo del agua al interior de estos vasos conductores (Peterson *et al.*, 1993).

El **periciclo** es la capa de células meristemáticas que forma parte del cilindro vascular y se localiza justo en la cara interna de la endodermis (Fig. 3.2). La desdiferenciación de las células del periciclo da lugar a la formación del primordio de las raíces laterales (Esau, 1967; Dubrovsky y Forde, 2012). Dependiendo de la especie, éstas pueden derivar de células del periciclo adyacentes a los polos del xilema (como es el caso de *Arabidopsis*) o a los polos del floema (como es el caso del maíz) (Casero *et al.*, 1995; De Smet *et al.*, 2003).

El **xilema** está constituido principalmente por células muertas conectadas entre sí formando conductos (traqueidas y vasos) cuya función principal es el transporte de agua e iones desde la raíz hacia el resto de la planta (Russell, 1977) (Hacke *et al.*, 2001). Estos conductos xilemáticos están rodeados por células parenquimáticas cuya función principal es facilitar y controlar el flujo de iones y agua hacia y desde el xilema (De Boer y Volkov, 2003). Pequeñas aperturas en la pared celular secundaria (punteaduras) permiten la comunicación entre los conductos y el parénquima adyacente (Choat *et al.*, 2003). En la fase inicial de desarrollo del xilema (protoxilema) los vasos se agrupan presentando una distribución diarca (dos polos), triarca (tres polos) y así sucesivamente (Picken *et al.*, 1986). En aquellas plantas, como el tomate, que presentan crecimiento secundario de la raíz, el xilema se encuentra rodeado de células pertenecientes al cambium vascular, que conforme se dividen pueden diferenciarse tanto en células xilemáticas como floemáticas (McCully, 1995; Rich y Watt, 2013). El **floema**, cuyo principal cometido es la distribución de azúcares y otros compuestos de diversa naturaleza química hacia todas las partes de la planta, está constituido por elementos conductores (vasos cribosos) y no conductores (fibras de esclerenquima y las células parenquimáticas) (Russell, 1977). Al igual que el xilema, el floema presenta dos fases de desarrollo (protofloema y metafloema) y sus componentes se localizan formando haces vasculares que se intercalan entre los del xilema.

3.1.3. Elección del método de estudio

La interacción genotipo-ambiente tiene un enorme efecto sobre las características de arquitectura de la raíz (de Dorlodot *et al.*, 2007). Por ello, la mayoría de los estudios sobre estos caracteres se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio con semillas germinadas en rollos de papel, entre dos placas de vidrio o en placas de Petri utilizando medios de cultivo con diferente composición (MacGregor *et al.*, 2008; Dubrovsky y Forde, 2012; Gruber *et al.*, 2013), lo cual dificulta la comparación y extrapolación de resultados. Aún más complejo es el traslado de conclusiones a partir de trabajos realizados en campo con plantas adultas, puesto que habría que añadir el efecto de situaciones específicas del escenario de cultivo (cultivo en suelo o en sustratos artificiales, salinidad, humedad ambiental) y que pueden inducir o inhibir la formación de nuevas raíces (Jung y McCouch, 2013; Wachsman *et al.*, 2015).

Por todo lo expuesto, en el presente trabajo se optó por llevar a cabo el estudio de la arquitectura de la raíz en plántulas cultivadas en medio hidropónico, siguiendo la recomendaciones de Tuberosa *et al.* (2003) que aconsejan este tipo de cultivo para el estudio de la arquitectura de la raíz, ya que permite observar el desarrollo de las raíces sin establecer las limitaciones que presentan los estudios en medio sólido, garantizando la homogeneidad en la disponibilidad de agua y nutrientes. En este mismo tipo de medio de cultivo se realizó el estudio de la anatomía interna de la raíz. Además, en nuestro caso mantener las condiciones de estudio en medio hidropónico nos permitía poder evaluar los resultados en relación a la Lpr registrada anteriormente.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

La determinación de la tasa de elongación del sistema radicular y la caracterización de parámetros relacionados con la arquitectura de la raíz se llevaron a cabo en los dos genotipos parentales y en las 13 líneas RILs en las que previamente se había determinado la conductividad hidráulica (ver capítulo 2, Tabla 2.1, página 81). Para ello, se siguió el mismo protocolo ya expuesto en el capítulo 2 (ver página 81), tanto para la implantación del cultivo como para el mantenimiento del mismo en cámara de cultivo tipo Fitotrón hasta alcanzar los 14 DDG (Fig.3.3).

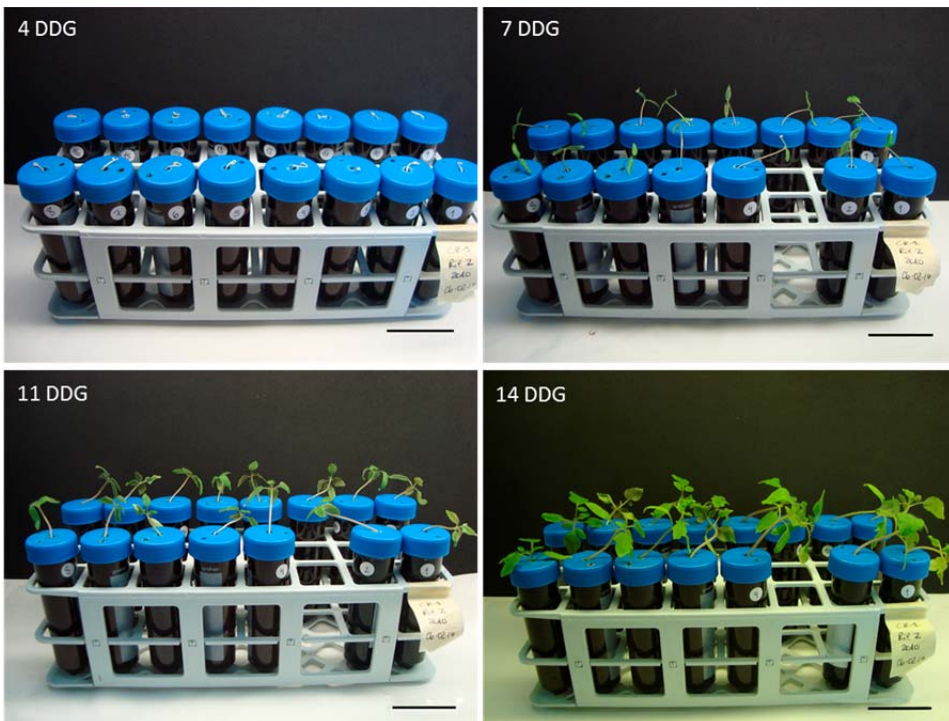


Figura 3.3. Desarrollo de las plantas a los 4, 7, 11 y 14 DDG crecidas en cámara de cultivo tipo Fitotrón y medio hidropónico. Barra equivale a 5 cm.

El estudio de la anatomía interna de la raíz se llevó a cabo en plantas adultas, con una edad de 50-60 DDG. Este estadio corresponde al inicio de la floración

de los primeros racimos. En este momento la demanda de agua de la parte aérea empieza a experimentar un incremento considerable, puesto que la necesidad de agua para satisfacer la demanda transpiratoria se une a la demanda de agua necesaria para el desarrollo de los frutos (Fig.3.4). El proceso de preparación y cultivo del material vegetal necesario para este estudio anatómico fue similar al descrito en el capítulo 1 (ver inicio página 42) con la diferencia de que este ensayo se llevó a cabo en periodo de primavera en un invernadero de vidrio (Fig.3.4C), la solución nutritiva tipo Hoagland modificada para tomate (ver capítulo 1, Tabla 1.1, página 42) estaba diluida a la mitad y el reabastecimiento de la solución nutritiva se llevó a cabo tres veces por semana. Así se garantizaba que no hubiera incremento en la concentración de sales de la solución nutritiva, ya que el consumo hídrico experimentado por las plantas en el invernadero era superior al registrado en la cámara de cultivo.



Figura 3.4. Desarrollo de las plantas utilizadas para el estudio de la anatomía interna de la raíz. (A) Aspecto general de la parte aérea y (B) del sistema radicular de las plantas. (C) Invernadero de vidrio utilizado en los ensayos de anatomía interna de la raíz en las líneas RILs seleccionadas.

3.2.2. Determinación de la tasa de elongación del sistema radicular

Para la determinación de la tasa de elongación del sistema radicular se utilizaron entre 10 y 40 plantas de cada genotipo (13 líneas RILs y dos genotipos

parentales). De cada planta se tomaron imágenes digitalizadas en escala de grises (400 dpi) a los días 4, 7, 11 y 14 DDG usando el mismo escáner utilizado en el capítulo 2. Por último, y tras eliminar el ruido de fondo con el programa Adobe Photoshop, las imágenes se analizaron con el programa WinRhizo Pro para determinar la longitud total del sistema radicular en cada día. La tasa de elongación del sistema radicular se calculó para los periodos comprendidos entre los días 4 y 7 (periodo 1), los días 7 y 11 (periodo 2) y los días 11 y 14 (periodo 3) y los días 4 y 14 mediante la siguiente expresión:

$$\text{Tasa elongación del sistema radicular} = \frac{\text{Longitud raíz final} - \text{Longitud raíz inicial}}{\text{Tiempo final} - \text{Tiempo inicial}} \quad (14)$$

3.2.3. Densidad de ramificación del sistema radicular

La densidad de ramificación se determinó en plantas de 14 días de desarrollo mediante el análisis de imágenes digitalizadas de las raíces a esta edad con el programa WinRhizo Pro. Dicho análisis permitió obtener la longitud de la raíz primaria o principal y de las raíces laterales. A esta edad, las plántulas carecían de raíces adventicias. En la raíz primaria o principal, se determinó la longitud de dos zonas relacionadas con el desarrollo de las raíces laterales: la **zona de ramificación aparente**, que se extiende desde el inicio de la raíz propiamente dicho hasta la última raíz lateral emergida, y la **zona sin ramificación aparente**, que se extiende desde la última raíz lateral emergida hasta el ápice de la raíz (Dubrovsky *et al.*, 2011).

La densidad de ramificación (número de raíces laterales cm⁻¹) se obtuvo dividiendo el número total de raíces laterales emergidas por la longitud de la zona de ramificación (Dubrovsky y Forde, 2012).

3.2.4. Anatomía interna de la raíz

El estudio de la anatomía interna de la raíz se llevó a cabo en dos plantas por genotipo (3 raíces por planta) realizando cortes transversales a mano alzada (en torno a 0,3 mm de grosor) a 15 mm del ápice (Fig.3.4). Para contrastar las paredes celulares en dichos cortes se usó Azul de Toluidina al 0,5% (p/v) durante 1 min. Este colorante acidófilo tiñe de color azul las paredes celulares, ricas en celulosa (O'Brien *et al.*, 1964). Una cámara fotográfica (MoticamPro 285B) acoplada a un microscopio de campo claro (Nikon Optiphot) permitió la captura de las imágenes de los cortes transversales que posteriormente se analizaron con el programa ImageJ (versión 1.48, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Este programa permitió obtener los valores de diámetro de la raíz, diámetro del cilindro vascular y anchura del córtex. El número de células que conforman el córtex se obtuvo por conteo directo sobre de las imágenes. En estas imágenes también se determinó el número de vasos xilemáticos y el diámetro de los mismos, siendo el número de réplicas utilizadas menor (entre 3 y 6 raíces por genotipo) debido a que no todas las imágenes obtenidas permitieron visualizar correctamente los vasos xilemáticos ya sea por rotura de los mismos a la hora de realizar el corte transversal o por una mala calidad de la imagen.

3.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático SPSS versión 18 mediante el mismo procedimiento utilizado en el capítulo 2 (ver página 88).

3.3. Resultados

3.3.1. Longitud y tasa de elongación del sistema radicular

Las imágenes escaneadas a los 4, 7, 11 y 14 DDG permitieron obtener la secuencia de crecimiento del sistema radicular en los primeros días del desarrollo. Como ejemplo, se muestra en la Figura 3.5 la evolución del sistema radicular del parental MM durante este periodo de tiempo.

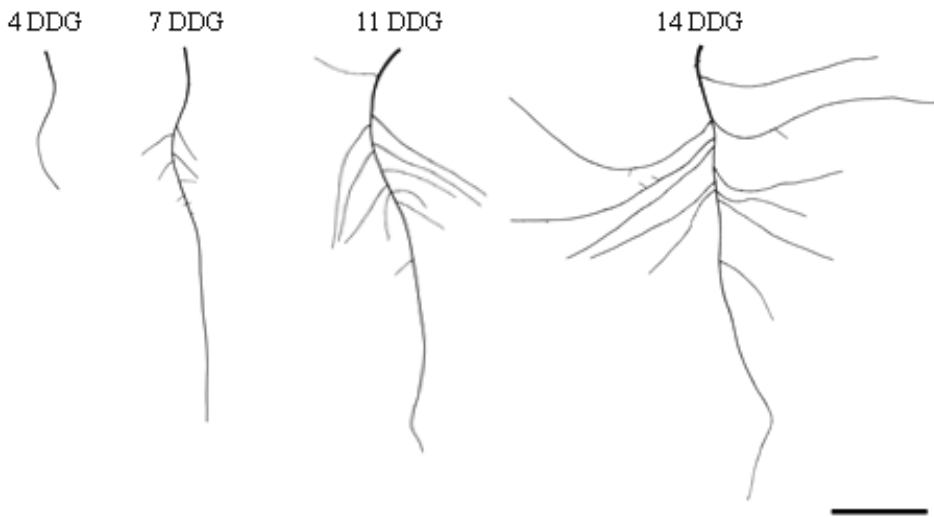


Figura 3.5. Secuencia de desarrollo del sistema radicular del parental doméstico MM. Barra equivale a 2 cm.

El análisis de las imágenes escaneadas del sistema radicular permitió determinar la longitud total de las raíces a los 4, 7, 11 y 14 DDG, mostrando una variación significativa entre los genotipos analizados (Tabla 3.1). A los 4 DDG, donde la longitud de la raíz en todos los genotipos correspondía exclusivamente a la longitud de la raíz primaria, ya se observaron diferencias significativas entre los distintos genotipos, registrándose los valores más elevados en el parental silvestre TO-937 y en las líneas RIL 59, 65 y 112. El valor medio de la longitud de raíz registrado en estos genotipos ($3,5 \pm 0,1$ cm) fue un 49% superior a los valores de longitud registrado en las RILs 121, 115 y 175, que fueron las que

presentaron menor longitud. A los 7 DDG, se registraron diferencias entre genotipos de más del 28%. Las RILs 59 y 68 presentaron los valores más elevados con un promedio de $9,5 \pm 0,2$ cm mientras que en las RILs 175, 121, 115, 73, 94 y 38 se registraron los valores más bajos con un promedio de $6,8 \pm 0,2$ cm. A los 11 y 14 DDG, la longitud del sistema radicular más elevada se registró en la RIL 68, siendo un 60% y un 72% mayor, a los 11 y 14 DDG respectivamente, con respecto a la RIL 121.

Tabla 3.1. Longitud total de la raíz (cm) de 13 líneas RILs derivadas del cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (MM) x *Solanum pimpinellifolium* (TO-937), registrada a los 4, 7, 11 y 14 DDG. Datos representados como media \pm SE (n = 10-40 plántulas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

Genotipos	4 DDG	7 DDG	11 DDG	14 DDG
MM	$2,5 \pm 0,1^{bcd}$	$8,9 \pm 0,3^{ab}$	$22,2 \pm 1,1^b$	$40,7 \pm 2,4^{bc}$
TO-937	$3,4 \pm 0,2^a$	$8,9 \pm 0,3^{ab}$	$17,3 \pm 0,8^{bcd}$	$25,2 \pm 2,0^{de}$
RIL 2	$2,9 \pm 0,1^{abc}$	$8,0 \pm 0,2^{abc}$	$20,3 \pm 1,3^{bcd}$	$47,7 \pm 3,8^b$
RIL 38	$2,9 \pm 0,1^{abc}$	$7,5 \pm 0,2^c$	$14,7 \pm 0,9^{cd}$	$23,0 \pm 1,6^{de}$
RIL 59	$3,7 \pm 0,2^a$	$9,8 \pm 0,3^a$	$19,7 \pm 1,2^{bcd}$	$31,6 \pm 2,3^{bcde}$
RIL 65	$3,6 \pm 0,2^a$	$8,0 \pm 0,4^{abc}$	$19,7 \pm 1,4^{bcd}$	$35,9 \pm 1,9^{bcd}$
RIL 66	$2,2 \pm 0,1^{cd}$	$7,6 \pm 0,2^{bc}$	$17,7 \pm 1,3^{bcd}$	$32,4 \pm 2,7^{bcd}$
RIL 68	$2,9 \pm 0,2^{ab}$	$9,3 \pm 0,3^a$	$34,7 \pm 2,2^a$	$74,2 \pm 6,5^a$
RIL 73	$3,0 \pm 0,2^{ab}$	$7,0 \pm 0,4^c$	$15,4 \pm 1,1^{cd}$	$30,1 \pm 3,0^{cde}$
RIL 94	$2,5 \pm 0,1^{bcd}$	$7,3 \pm 0,3^c$	$16,2 \pm 0,5^{cd}$	$28,9 \pm 1,7^{cde}$
RIL 98	$2,3 \pm 0,1^{bcd}$	$7,5 \pm 0,2^{bc}$	$17,2 \pm 2,0^{bcd}$	$33,0 \pm 4,1^{bcd}$
RIL 112	$3,4 \pm 0,2^a$	$7,7 \pm 0,4^{bc}$	$20,9 \pm 1,6^{bc}$	$36,2 \pm 3,7^{bcd}$
RIL 115	$1,8 \pm 0,1^d$	$6,8 \pm 0,3^c$	$20,1 \pm 1,8^{bcd}$	$35,1 \pm 4,3^{bcd}$
RIL 121	$1,8 \pm 0,2^d$	$6,3 \pm 0,2^c$	$13,9 \pm 0,8^d$	$20,7 \pm 1,3^e$
RIL 175	$1,9 \pm 0,1^d$	$6,2 \pm 0,1^c$	$14,7 \pm 0,9^{cd}$	$22,8 \pm 1,8^{de}$

La representación gráfica de estos valores (Fig.3.6) permitió observar dos tipos de dinámica en la elongación del sistema radicular durante los primeros 14 DDG. En el parental silvestre TO-937 y las RILs 38, 59, 121 y 175 esta

dinámica se ajustó a una función lineal con una $r^2 \geq 0,98$ (Fig.3.6A). En el parental doméstico MM y el resto de líneas RILs la dinámica de elongación se ajustó a una función de tipo exponencial valores de $r^2 \geq 0,97$ (Fig.3.6B).

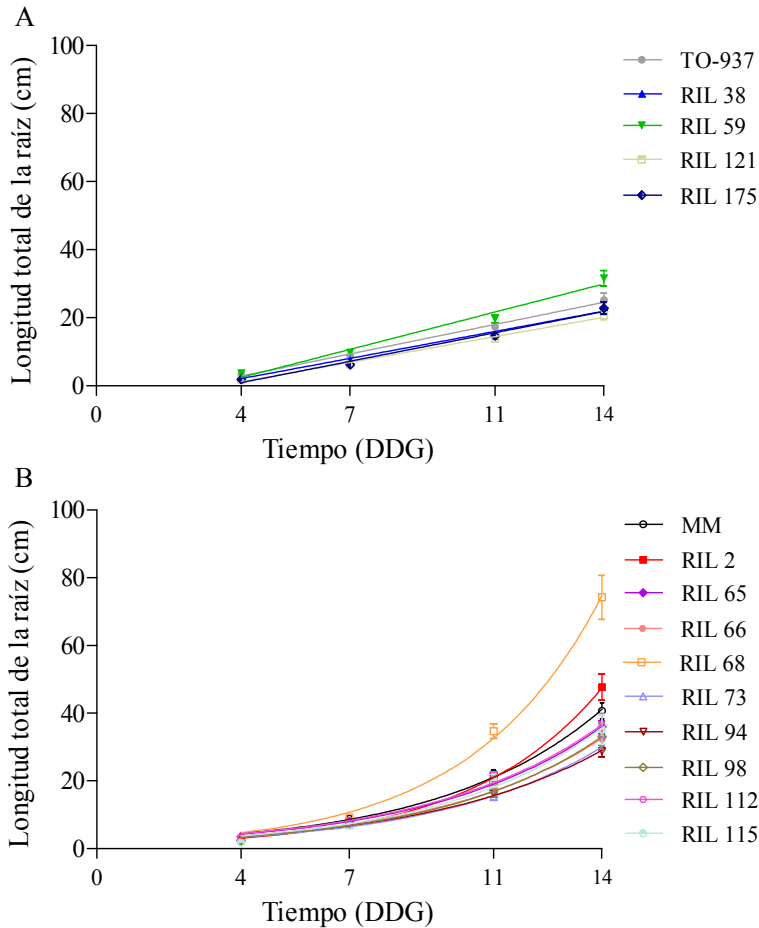


Figura 3.6. Ajuste de la dinámica de elongación del sistema radicular durante los 14 DDG. (A) Ajuste a una función lineal $r^2 \geq 0,98$. (B) Ajuste a una función exponencial $r^2 \geq 0,97$. Datos representados como media \pm SE (n = 10-40 plántulas por genotipo).

En cada uno de los tres periodos en que se dividió el tiempo de estudio, se observaron diferencias significativas entre genotipos para la tasa de elongación del sistema radicular. Estas diferencias se hicieron más acusadas conforme avanzaba el tiempo (Fig. 3.7). La tasa de elongación en el periodo 1 (4-7 DDG) mostró una diferencia de más del 35% entre algunos genotipos. La RIL 68 y el

parental doméstico MM fueron los genotipos que presentaron las mayores tasas de elongación ($0,71 \pm 0,03 \text{ cm d}^{-1}$ y $0,71 \pm 0,02 \text{ cm d}^{-1}$, respectivamente), mientras que en la RIL 73 y RIL 112 se registraron las menores tasas de elongación con un valor de $0,45 \pm 0,02 \text{ cm d}^{-1}$ y $0,47 \pm 0,03 \text{ cm d}^{-1}$, respectivamente (Fig.3.7A). En el periodo 2 (7-11 DDG, Fig.3.7B) y en el periodo 3 (11-14 DDG, Fig.3.7C), la RIL 68 presentó las mayores tasas de elongación ($1,59 \pm 0,1 \text{ cm d}^{-1}$ y $4,4 \pm 0,5 \text{ cm d}^{-1}$, respectivamente). Estos valores fueron superiores en un 72% con respecto a la RIL 38 y en un 83% con respecto a la RIL 121.

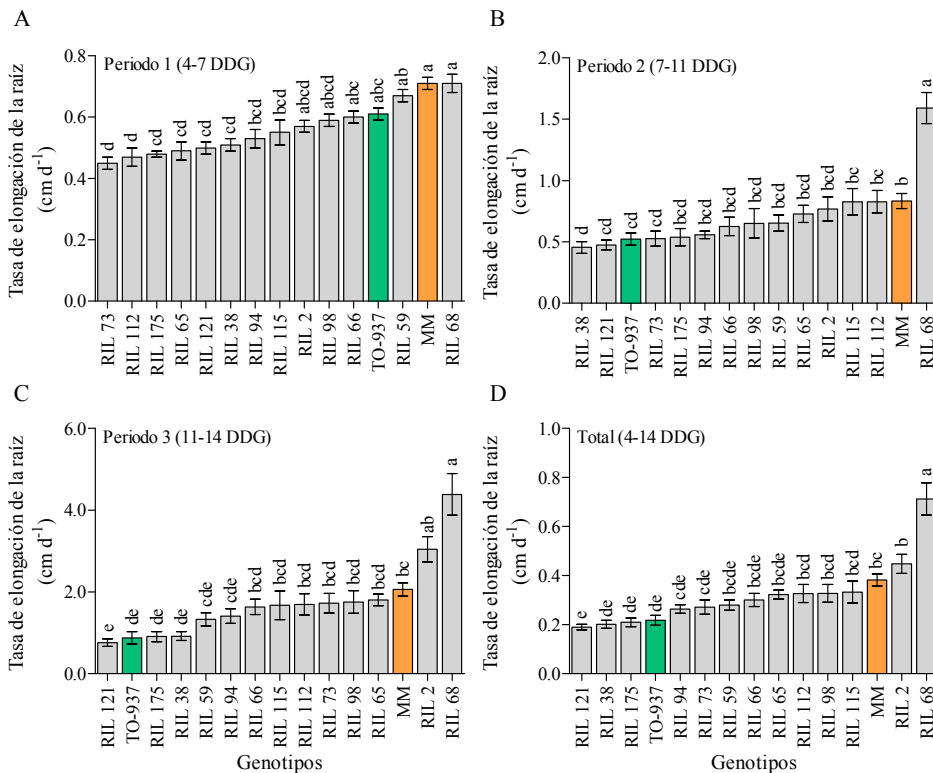


Figura 3.7. Tasas de elongación del sistema radicular en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas. (A) Fase 1 de crecimiento comprendida entre los 4 y los 7 DDG. (B) Fase 2 de crecimiento comprendida entre los 7 y los 11 DDG. (C) Fase 3 de crecimiento comprendida entre los 11 y 14 DDG. (D) Tasa de elongación entre los 4 y los 14 DDG. Datos representados como media \pm SE ($n = 10-40$ plántulas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

La tasa de elongación, calculada para el periodo comprendido entre los 4 y los 14 DDG, también mostró una gran variación significativa entre las distintas líneas, siendo en RIL 68 un 71% superior con respecto a la registrada en RIL 121 (Fig.3.7D). Como consecuencia a los 14 DDG, la RIL 68 presentó una longitud total de la raíz 3,5 veces superior a la presentada en RIL 121 (Tabla 3.1).

3.3.2. Ramificación del sistema radicular

El sistema radicular que presentaban todos los genotipos a los 14 DDG estaba compuesto por una raíz primaria y un número variable de raíces laterales secundarias. En el parental doméstico MM y en las RILs 68 y 94, en este estadio de desarrollo también se pudieron observar raíces laterales terciarias (Fig.3.8). El análisis visual de las imágenes digitalizadas a los 4, 7, 11 y 14 DDG permitió determinar que la formación de nuevas raíces laterales secundarias no se produjo de un modo estrictamente acropétalo, puesto que las raíces de menor longitud no siempre eran las más cercanas al ápice.

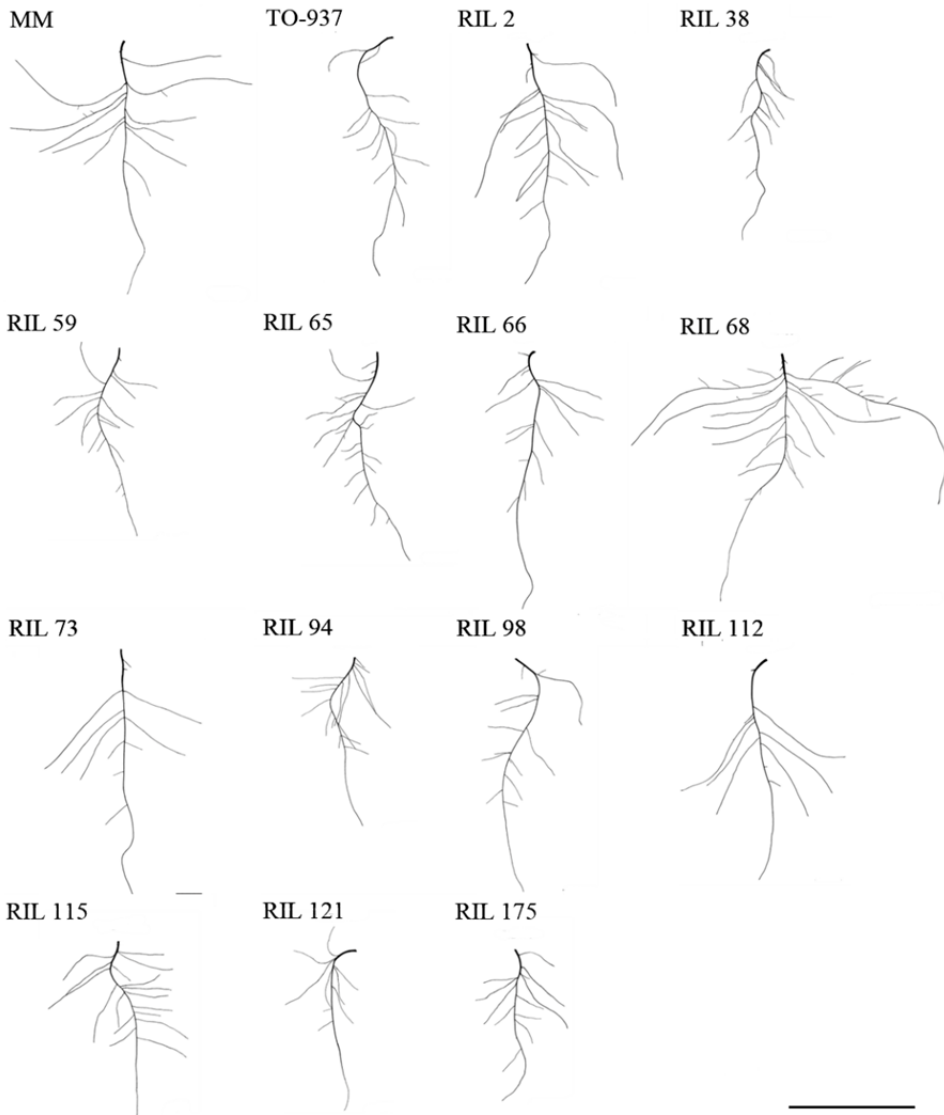


Figura 3.8. Fenotipo de raíz de 13 líneas RILs seleccionadas derivadas del cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (MM) x *Solanum pimpinellifolium* (TO-937) a 14 DDG. Barra equivale a 5cm.

La longitud de la raíz primaria a los 14 DDG mostró diferencias de un 36% entre los genotipos que alcanzaron los valores más elevados (parental silvestre TO-937 con una longitud de la raíz primaria de $10,5 \pm 0,5$ cm) y aquellos que presentaron los menores valores (RIL 175 y RIL 94 con una longitud de la raíz

principal de $6,4 \pm 0,2$ cm y $7,0 \pm 0,2$ cm, respectivamente) (Fig.3.9). En la raíz primaria, tomando como referencia la posición de la última raíz lateral emergida, se distinguen la zona de ramificación aparente, en la que son visibles raíces laterales con diferente longitud, y la zona sin ramificación aparente, en la que no son visibles raíces laterales, aunque pueda haber primordios que estén avanzando el córtex en dirección a la superficie de la raíz. Más del 50% de la longitud de la raíz primaria de todos los genotipos analizados estuvo ocupada por la zona de ramificación, llegando en algunos casos (RILs 59 y 65) a ocupar más del 70%. Las líneas RILs 65, 68 y 59 presentaron la mayor longitud de la zona de ramificación (en torno a 7,1 cm), siendo este valor casi el doble del registrado en la RIL 121 ($3,8 \pm 0,3$ cm). Los genotipos parentales y las líneas RILs 66 y 98 presentaron la mayor longitud de la zona sin ramificación aparente, con valores comprendidos entre $3,8 \pm 0,2$ cm para MM y $4,2 \pm 0,3$ cm para la RIL 66.

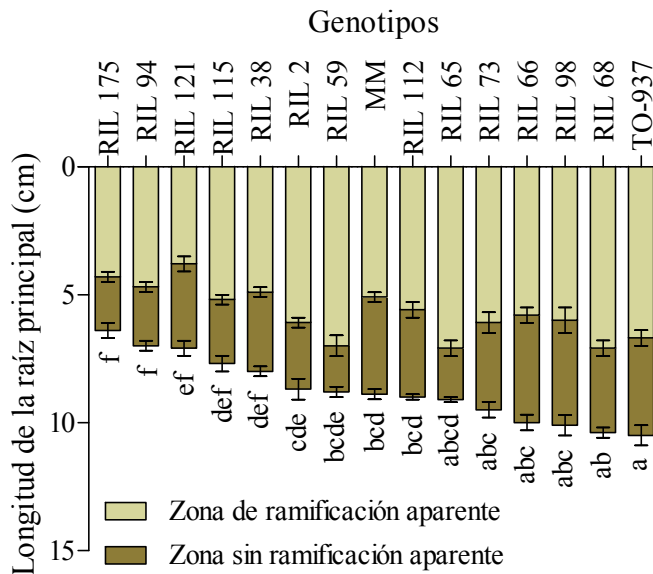


Figura 3.9. Distribución de la longitud correspondiente a las zonas de ramificación aparente y sin ramificación aparente de la raíz primaria en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a 14 DDG. Datos representados como media \pm SE ($n = 10-40$ plántulas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

El número de raíces laterales emergidas a lo largo de la raíz primaria mostró variaciones significativas entre los genotipos. Las líneas con mayor número de raíces laterales fueron las RILs 68, 65, 59 y 2, con un valor aproximado de 21 raíces, lo que supone casi el doble del número de raíces laterales que presentaron las RILs 121, 66, 112 y 38 (Fig.3.10A). Por otro lado, la longitud de estas raíces secundarias mostró una gran variabilidad, observándose diferencias de más del 70% entre los genotipos analizados. Considerando la longitud correspondiente a la suma de la longitud de todas las raíces laterales, la RIL 68 presentó el valor más elevado ($55,8 \pm 5,4$ cm) mientras que las RILs 121 y 38 fueron las que presentaron los valores más bajos ($13,7 \pm 1,2$ cm y $14,4 \pm 1,5$ cm, respectivamente) (Fig.3.10B).

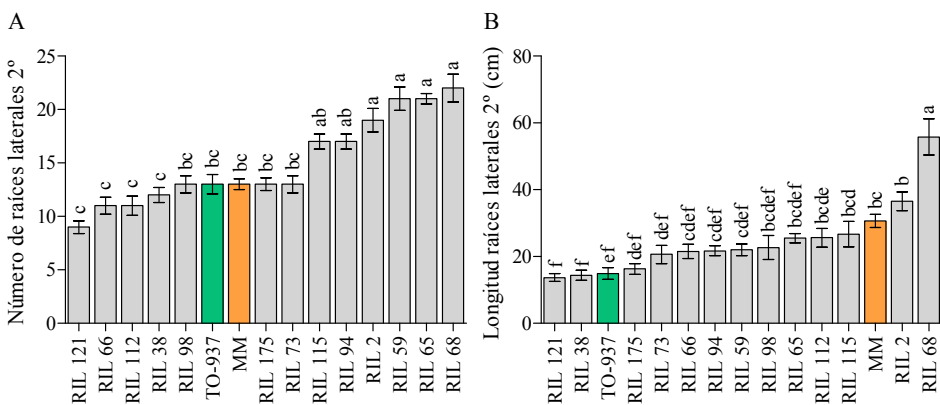


Figura 3.10. Raíces laterales en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a 14 DDG (A) Número de raíces laterales secundarias. (B) Longitud correspondiente al total de las raíces secundarias. Datos representados como media \pm SE (n = 10-40 plántulas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores de la longitud de la raíz primaria están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

A partir del número de raíces laterales emergidas y la longitud de la zona de ramificación se calculó la densidad de ramificación (Fig.3.11). Esta densidad de ramificación presentó diferencias de hasta un 40% entre algunos de los genotipos. La mayor densidad de ramificación se registró en la RIL 94, con un valor medio de $3,7 \pm 0,1$ raíces cm^{-1} , siendo este valor significativamente

superior al registrado en los genotipos parentales (1,4 veces superior con respecto a MM y 1,9 veces con respecto a TO-937).

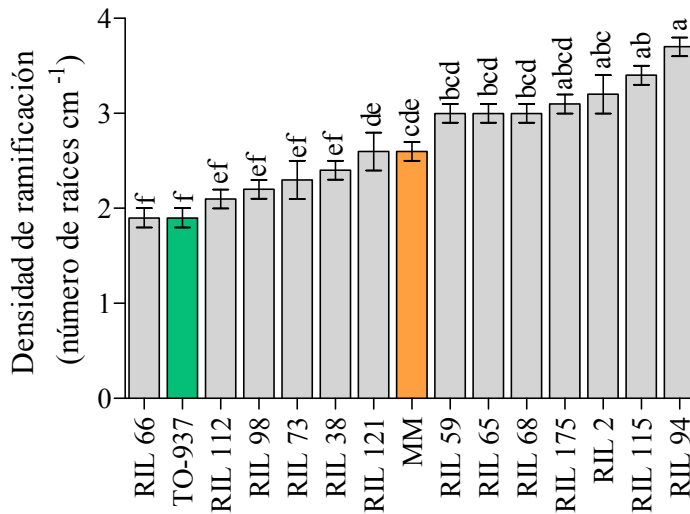


Figura 3.11. Densidad de ramificación en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a 14 DDG. Datos representados como media \pm SE (n = 10-40 plántulas por genotipo). Diferencias significativas entre los valores de la longitud de la raíz primaria están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

3.3.3. Anatomía interna de la raíz

A 15 mm del ápice, la raíz mostró un crecimiento primario (Fig.3.12/Fig.3.13). La mayor parte de los cortes transversales analizados, correspondientes a los genotipos parentales y a las 13 líneas RILs, presentaron polos xilemáticos con una distribución diarca. Sin embargo, en algunas líneas RILs pudieron observarse raíces laterales que presentaron una distribución triarca. De las 6 raíces analizadas para cada genotipo, el patrón de distribución triarca se observó en una sola raíz (RIL 65), en dos raíces (RIL 94) o en tres raíces (RIL 98).

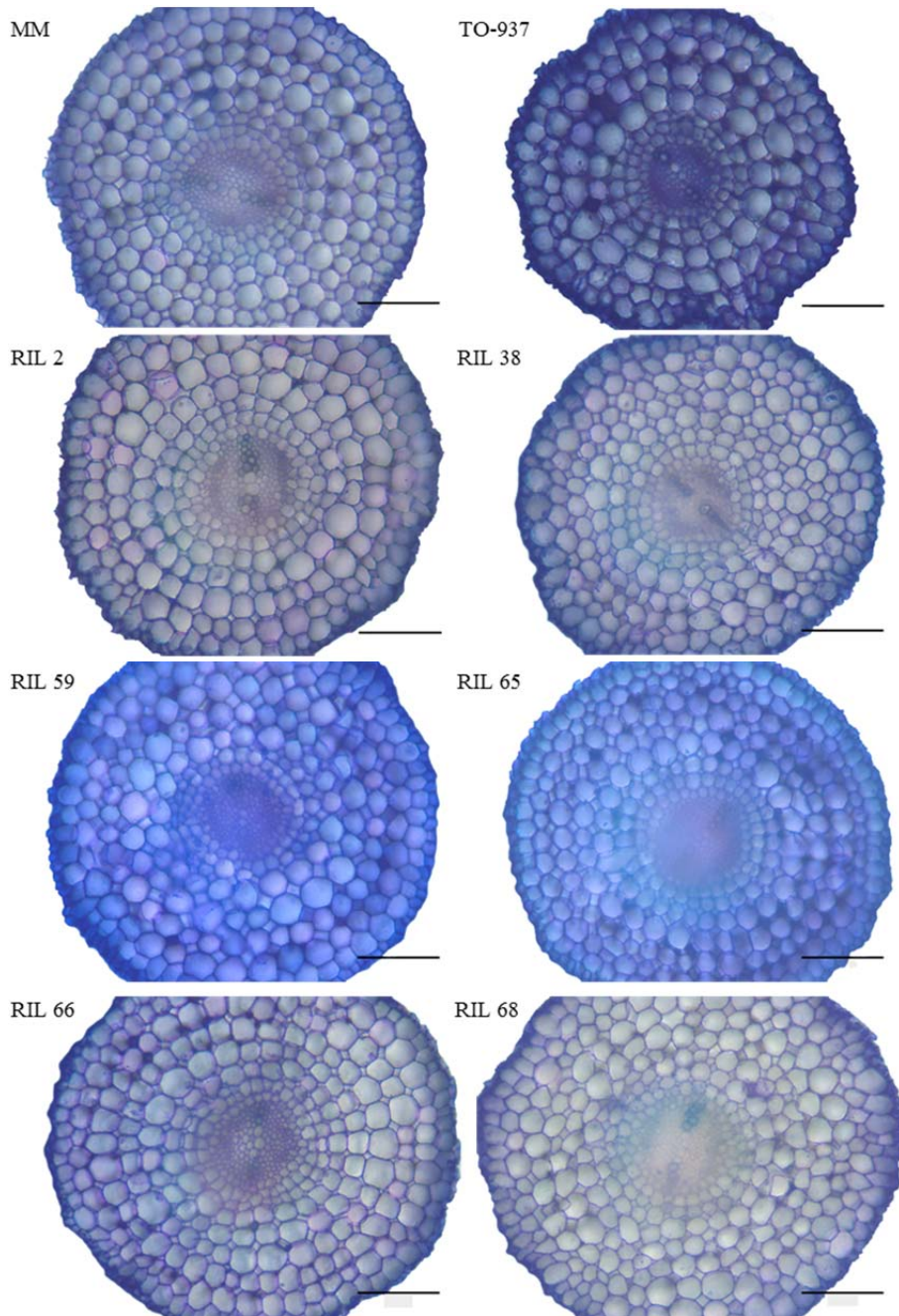


Figura 3.12. Secciones transversales de raíces laterales en los dos genotipos parentales y en 6 líneas RILs seleccionadas. Cortes realizados a mano alzada (~0,3 mm de grosor) a 15 mm del ápice y teñidos con Azul de Toluidina 0,5% (p/v) y posterior visualización con un microscopio óptico convencional (10x). Barra equivale a 100 μ m.

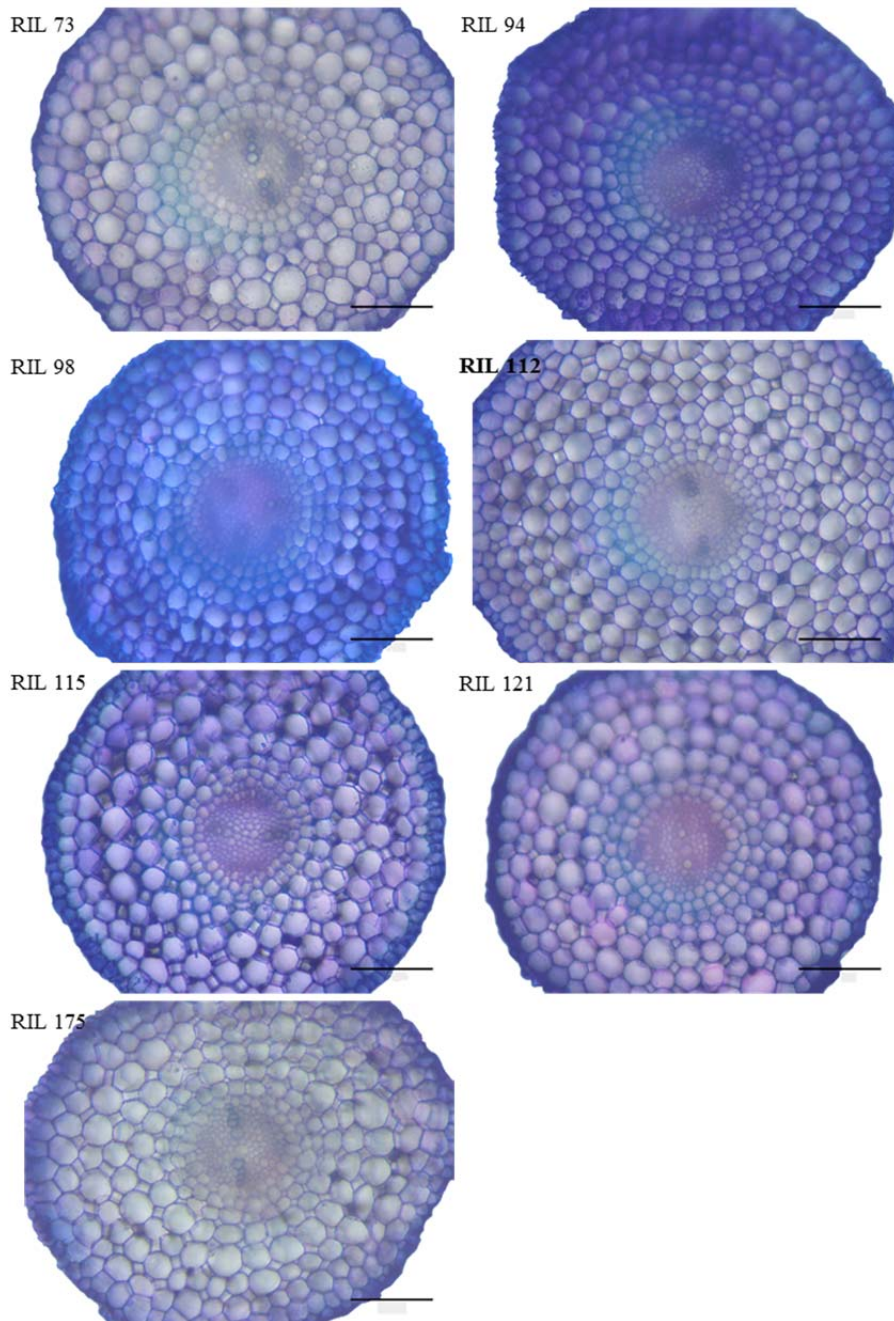


Figura 3.13. Secciones transversales de raíces laterales en 7 líneas RILs seleccionadas. Cortes realizados a mano alzada (~0,3 mm de grosor) a 15 mm del ápice y teñidos con Azul de Toluidina 0,5% (p/v) y posterior visualización con un microscopio óptico convencional (10x). Barra equivale a 100 μm .

No se registraron diferencias significativas entre los genotipos analizados en relación al diámetro de la raíz, a la anchura y número de capas de células del córtex o al diámetro del cilindro vascular. A 15 mm de distancia del ápice, los 15 genotipos analizados mostraron un diámetro medio de raíz de $503 \pm 7,1 \mu\text{m}$, una anchura del córtex de $172 \pm 2,8 \mu\text{m}$ formado por una media de $6 \pm 0,2$ capas corticales y un diámetro del cilindro vascular de $159 \pm 2,5 \mu\text{m}$ (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Características anatómicas de raíces laterales registradas en cortes transversales efectuados a 15 mm del ápice en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas. Datos representados como media \pm SE ($n = 6$ raíces por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

Genotipos	Diámetro de la raíz (μm)	Anchura del córtex (μm)	Capas celulares en el córtex (n°)	Diámetro cilindro vascular (μm)
MM	467 ± 22^a	155 ± 7^a	$6 \pm 0,2^a$	157 ± 11^a
TO-937	505 ± 39^a	176 ± 14^a	$6 \pm 0,5^a$	153 ± 12^a
RIL 2	529 ± 35^a	174 ± 13^a	$6 \pm 0,5^a$	180 ± 10^a
RIL 38	518 ± 26^a	174 ± 9^a	$7 \pm 0,2^a$	170 ± 8^a
RIL 59	464 ± 9^a	155 ± 4^a	$6 \pm 0,2^a$	153 ± 4^a
RIL 65	490 ± 45^a	169 ± 17^a	$6 \pm 0,7^a$	153 ± 13^a
RIL 66	481 ± 50^a	169 ± 20^a	$6 \pm 0,8^a$	144 ± 10^a
RIL 68	490 ± 39^a	168 ± 14^a	$6 \pm 0,5^a$	154 ± 11^a
RIL 73	537 ± 25^a	184 ± 8^a	$7 \pm 0,4^a$	169 ± 11^a
RIL 94	508 ± 23^a	178 ± 8^a	$7 \pm 0,2^a$	152 ± 7^a
RIL 98	507 ± 18^a	172 ± 7^a	$6 \pm 0,3^a$	163 ± 6^a
RIL 112	565 ± 31^a	199 ± 13^a	$7 \pm 0,6^a$	167 ± 9^a
RIL 115	474 ± 23^a	161 ± 8^a	$5 \pm 0,3^a$	151 ± 8^a
RIL 121	511 ± 19^a	172 ± 7^a	$7 \pm 0,3^a$	168 ± 6^a
RIL 175	498 ± 27^a	172 ± 9^a	$6 \pm 0,3^a$	153 ± 9^a

La anatomía del cilindro vascular presentó diferencias significativas entre algunos de los genotipos en relación al número de vasos xilemáticos y al diámetro medio de los mismos. El parental doméstico MM y las líneas RILs 94, 112, 2, 121, 59 y 73 presentaron el mayor número de vasos xilemáticos, con un

valor aproximado de $12 \pm 0,7$ vasos por corte transversal de raíz. Este número supuso el doble de vasos xilemáticos registrados en el parental silvestre TO-937, en el que se registraron los valores más bajos ($6 \pm 0,5$ vasos por corte transversal) (Fig.3.14A).

En la figura 3.14C se muestra el cilindro vascular de TO-937 y de RIL 112 en el que se pueden observar diferencias en el número y diámetro de los vasos xilemáticos (asteriscos). En cuanto al diámetro medio de todos los vasos xilemáticos presentes en la sección transversal de raíz (Fig.3.14B), el parental TO-937 presentó el mayor valor ($10,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$) siendo éste en torno a un 28% superior al registrado en las líneas RIL 112 y 94. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre los parentales de la población RIL.

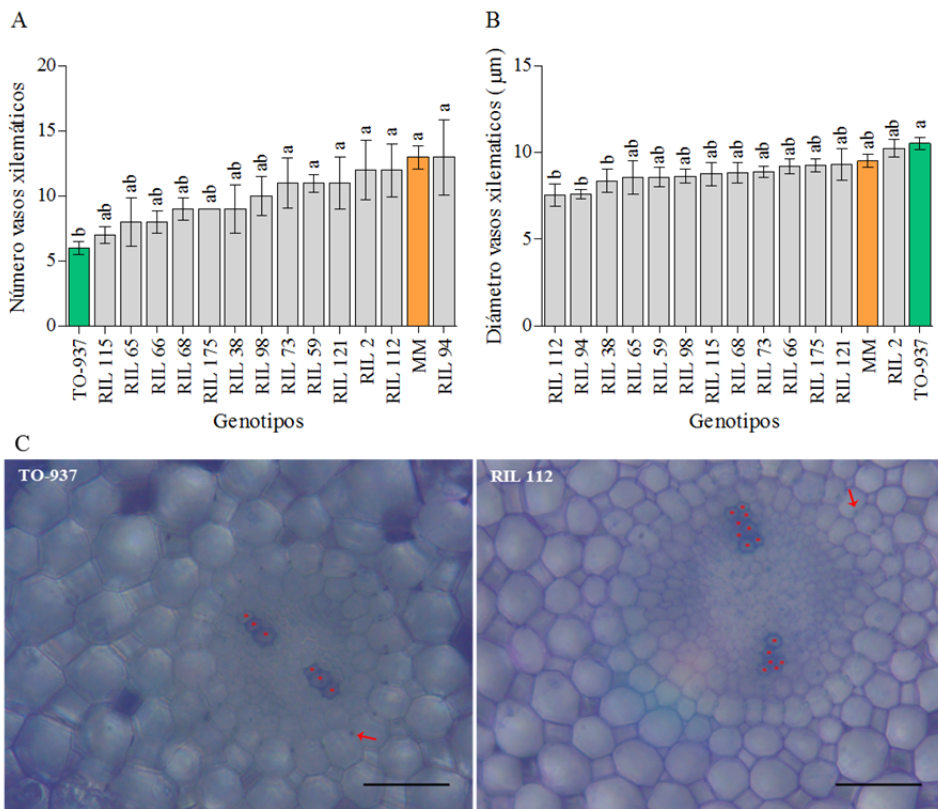


Figura 3.14. Anatomía interna del cilindro vascular en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas. (A) Número de vasos xilemáticos y (B) diámetro de los

mismos. Datos representados como media \pm SE ($n = 3-6$ raíces por genotipo). Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni). (C) Secciones transversales de TO-937 y RIL 112. Corte realizado a mano alzada ($\sim 0,3$ mm de grosor) a 15 mm del ápice y teñido con Azul de Toluidina 0,5% (p/v) y posterior visualización con un microscopio óptico convencional (20 x). Barra equivale a 50 μm . Asteriscos indican los vasos xilemáticos. Flecha señala las bandas de Caspary presentes en la endodermis.

3.4. Discusión

La arquitectura del sistema radicular está fundamentalmente determinada por el genotipo, aunque numerosos estudios en otras especies ponen de manifiesto su gran plasticidad según el medio circundante (Deak y Malamy, 2005; Osmont *et al.*, 2007; Hodge *et al.*, 2009; Ristova y Busch, 2014). En el presente estudio se abordó la caracterización de la arquitectura y anatomía interna del sistema radicular en raíces desarrolladas en un corto periodo de tiempo posterior a la germinación (14 DDG) en medio hidropónico, que no impone ningún tipo de limitación ni espacial ni al aporte de agua y nutrientes. De esta manera, la variabilidad encontrada en la arquitectura de la raíz en este estadio de desarrollo podría considerarse como resultado mayoritario de la expresión génica intrínseca a cada uno de los genotipos parentales y las líneas RILs evaluadas.

En relación con la tasa de elongación (Fig.3.7), los resultados mostraron que existe una amplia variabilidad entre los dos genotipos parentales y entre las 13 líneas RILs evaluadas en este apartado, con valores que oscilan entre 0,4 y 0,7 cm d⁻¹. Estos valores concuerdan en rango con los registrados por Ron *et al.* (2013) en plántulas de tomate de edad similar. El incremento de la longitud con respecto al tiempo fue lineal en el parental silvestre TO-937 y las RILs 38, 59, 121 y 175, mientras que se manifestó exponencial en el resto de genotipos (Fig.3.6.). Esta diferencia en la dinámica de crecimiento estuvo determinada, fundamentalmente, por la tasa de elongación de las raíces laterales secundarias, ya que los genotipos con crecimiento exponencial fueron los que presentaron raíces laterales más largas.

La tasa de elongación de la raíz es un parámetro que se ha utilizado en cultivos de cereales como criterio para la selección de genotipos tolerantes al estrés hídrico (Richards *et al.*, 2007; Palta *et al.*, 2011). Una mayor tasa garantiza el desarrollo de raíces largas, que pueden colonizar un volumen mayor de sustrato, favoreciendo de esta manera la captura de agua. Por tanto, dada la

variabilidad de este parámetro encontrada en este estudio, podría tenerse en cuenta para su uso como identificador de genotipos de tomate con mayor potencial de desarrollo del sistema radicular, que podría conllevar una mayor captura de agua. No obstante, dado que en los cultivos de invernadero el uso de sustratos artificiales conlleva el uso de contenedores de dimensiones reducidas, habría que determinar si un elevado desarrollo del sistema radicular en planta adulta podría inducir competencia por el agua entre las raíces de una misma planta. Además un elevado confinamiento del sistema radicular lo haría más susceptible a las fluctuaciones térmicas diarias, con el consiguiente efecto deletéreo sobre la conductividad hidráulica de las raíces (Falah *et al.*, 2010). Por el contrario, en cultivo en suelo, una alta tasa de elongación podría dar lugar a raíces profundas que explorarían un mayor volumen de sustrato, evitando las pérdidas de agua y nutrientes por lixiviado.

En cuanto a la densidad de ramificación, en el conjunto de las líneas RILs se han registrado diferencias de hasta un 40%, con valores que van desde 1,9 raíces cm^{-1} en la RIL 66 hasta valores de 3,7 raíces cm^{-1} en la RIL 94 (Fig.3.11). Tres líneas (RILs 2, 115 y 94) presentaron tasas de ramificación superiores al parental doméstico MM. La alta densidad de ramificación registrada en el parental doméstico, que fue un 27% superior a la registrada en el parental silvestre TO-937, parece indicar que en el proceso de domesticación ha tenido lugar un incremento de ramificación que ha favorecido la captura del agua aportada por el riego. Desde la perspectiva actual, mejorar la eficiencia del uso del agua requiere producir más con el mínimo volumen de riego, y una vía para conseguirlo podría ser reducir las pérdidas de agua de riego en forma de lixiviados mediante el incremento de la densidad de ramificación. La variabilidad en la densidad de ramificación documentada en esta tesis permite seleccionar genotipos contrastantes que podrán ser evaluados en relación a la eficiencia del uso del agua de riego y la productividad en distintas situaciones de cultivo comercial.

Existe una relación entre la longitud, la densidad de ramificación y el número de raíces laterales con una mayor capacidad para explorar un volumen determinado de sustrato por parte de los sistemas radiculares (Henry *et al.*, 2011). Desde esta perspectiva, líneas como la RIL 68 que supera al parental doméstico MM en tasa de elongación, número de raíces laterales y longitud de las mismas, debe ser un genotipo a considerar en futuras investigaciones, por su posible capacidad para obtener agua del medio.

No obstante, hay que tener en cuenta que la formación de raíces laterales y su mantenimiento conlleva un coste metabólico, que en términos de unidades de carbono puede exceder en algunos casos en más del 50% la producción fotosintética diaria (Lambers *et al.*, 2002). Recientes estudios empíricos y con modelos desarrollados en trigo y otros cereales están afianzando un nuevo paradigma que postula que reducir el coste metabólico de la captura de agua incrementa la productividad de los cultivos (Lilley y Kirkegaard, 2011; Zhan *et al.*, 2015). De esta manera una planta capaz de acceder al agua del sustrato con una menor inversión en el desarrollo y mantenimiento de sus raíces, podrá invertir más en el crecimiento vegetativo de la parte aérea. En este sentido la contribución de los pelos radiculares a la superficie de absorción es un parámetro que se debe considerar.

No hay datos concretos para tomate, pero en cebada se estima que la superficie de los pelos radiculares puede contribuir hasta en un 67% a la superficie total de la raíz (Nielsen *et al.*, 2001), siendo además la respuesta morfológica más inmediata frente cambios en las condiciones ambientales (Bates y Lynch, 2000). Resultados preliminares obtenidos durante el tiempo de ejecución del presente trabajo muestran diferencias entre genotipos en densidad y longitud de los pelos radiculares. El parental doméstico MM parece presentar mayor cantidad que el silvestre TO-937, existiendo una alta variabilidad entre las 13 líneas RILs estudiadas. Pero el estudio de este parámetro en tomate es complejo dado que la distribución de los pelos radiculares en la raíz de un

mismo genotipo es muy heterogénea y presenta una alta plasticidad a lo largo del desarrollo de la planta. Estos factores han impedido establecer un adecuado protocolo que permita llevar a cabo con garantía un estudio comparativo entre genotipos.

Considerando que un mayor diámetro de raíz, implicaría que el flujo radial del agua tendría que realizar un recorrido mayor hasta llegar a los vasos del xilema, diversos estudios en cítricos, espárragos, orquídeas o soja han mostrado que existe una correlación negativa entre el diámetro de la raíz y la conductividad hidráulica (Rieger y Litvin, 1999; Huang y Eissenstat, 2000). Los datos de homogeneidad en el diámetro de la raíz, anchura del córtex y número de capas celulares registrados en los genotipos estudiados (Tabla 3.2), no han permitido establecer posibles implicaciones de estos parámetros sobre la variabilidad registrada en la Lpr.

Un mayor calibre de los vasos del xilema favorece el flujo axial de agua (McCully, 1995; Huang y Eissenstat, 2000; Nicotra *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2014) dado que según la ley de Poiseuille-Hagen, el potencial de conducción de un cilindro es proporcional a la cuarta potencia del radio del mismo (Tyree y Ewers, 1991). Por tanto, pequeñas diferencias en el diámetro de los vasos del xilema y en el número total de vasos, pueden tener un gran efecto en la conductividad hidráulica desde el cilindro vascular de la raíz hacia la parte aérea de las plantas (Hummel *et al.*, 2007; Poorter *et al.*, 2010). En el trabajo llevado a cabo en esta tesis no se registraron diferencias significativas en el diámetro medio de los vasos del xilema de MM respecto a TO-937, pero sí en el número de vasos del xilema que en MM fue aproximadamente el doble que en TO-937 (Fig.3.14). El mayor número de vasos del xilema en MM pudo contribuir a la mayor Lpr registrada en este genotipo respecto a la registrada en TO-937. No obstante, cabe destacar que se identificaron RILs con un calibre y número de vasos del xilema similares a MM, como la RIL 2, en las que los valores de Lpr fueron sin embargo muy inferiores a los registrados en MM.

CAPÍTULO 4

TRANSPORTE RADIAL DE AGUA EN LA RAÍZ DE TOMATE: ACUAPORINAS Y BIOPOLÍMEROS DE BARRERA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4.1. Introducción

El movimiento radial del agua a través de la raíz tiene lugar por tres vías: la **vía apoplástica**, a través de las paredes celulares y los espacios intercelulares, la **vía simplástica**, a través de los plasmodesmos que conectan unas células con otras y la **vía transcelular**, a través de las membranas celulares ya sea por simple difusión o facilitado por acuaporinas. Debido a la falta de herramientas experimentales que permitan distinguir las dos últimas vías, éstas se agrupan en la denominada **vía célula a célula** (Steudle y Peterson, 1998; Steudle, 2000). El movimiento del agua a través de la vía transcelular responde a multitud de factores ambientales, los cuales pueden modificar tanto la expresión como la actividad de las acuaporinas, actuando así como elementos dinámicos del transporte (Maurel *et al.*, 2008). Por otro lado, los depósitos de biopolímeros de barrera en la raíz, principalmente suberina y lignina, actúan sobre el movimiento del agua a través de la vía apoplástica y de la vía transcelular, de una manera pasiva. Dentro del contexto de este trabajo de tesis doctoral, el estudio de las vías de transporte radial del agua en la raíz presenta un interés especial ya que puede ayudar a entender el porqué de las diferencias registradas en los valores de L_{pr} observados en las diferentes líneas estudiadas en los capítulos anteriores.

4.1.1 Acuaporinas en plantas

El transporte de agua a través de las membranas celulares puede darse por dos mecanismos principales: difusión a través de la bicapa lipídica y/o facilitado por pequeñas proteínas integrales de membrana, denominadas **acuaporinas (AQPs)**, que actúan a modo de canales de agua (Tyerman *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 2008). Durante años se pensó que el movimiento de agua a través de las membranas celulares se daba únicamente por difusión a través de la bicapa lipídica que constituye dicha estructura (Schäffner, 1998). Tras observar altas tasas de transporte a través de las membranas plasmáticas de eritrocitos y de células del tubo proximal renal que no podían explicarse simplemente por

difusión (Macey, 1984), a principios de los años 90 se identificó, en eritrocitos, la primera AQP denominada CHIP-28 (Preston y Agre, 1991; Preston *et al.*, 1992), hoy en día también conocida como AQP-1 por el Comité de Nomenclatura del Genoma Humano (http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:633).

Las AQPs son pequeñas proteínas integrales de membrana de baja masa molecular (entre 23 y 31 KDa) (Maurel *et al.*, 2008). Todas las AQPs descritas hasta la fecha pertenecen a la familia de **proteínas intrínsecas principales (MIPs)**, del inglés *Major Intrinsic Proteins*), nombrada así tras la identificación de la AQP-0 o proteína intrínseca principal en células del cristalino bovino (Gorin *et al.*, 1984; Tyerman *et al.*, 2002). Las MIPs se localizan en las membranas celulares de todo tipo de organismos, desde animales y plantas a microorganismos (Tyerman *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 2008). Estudios de expresión de las MIPs en levaduras y oocitos de *Xenopus* han demostrado que estas proteínas participan en el transporte bidireccional de agua (Maurel *et al.*, 1993; Rivers *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 2005) y en el de gran cantidad de pequeños solutos, como glicerol, urea, amonio, peróxido de hidrógeno, ácido salicílico o CO₂ (Agre *et al.*, 1998; Johanson *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2012). La relevancia del transporte de agua a través de estas proteínas pone de manifiesto su importancia en multitud de procesos fisiológicos, como la captación de agua a través de las raíces, o en procesos metabólicos clave, como la fijación del nitrógeno o del carbono. El término **acuaporina**, que inicialmente era utilizado únicamente para aquellas MIPs que actuaban como canales de agua, se aplica actualmente a todas las MIPs presentes en plantas (Maurel, 1997; Maurel *et al.*, 2008).

4.1.1.1 Clasificación de las AQPs

En plantas, las AQPs constituyen una gran familia cuyo número oscila entre los 24 genes de cebada, *Hordeum vulgare* (Besse *et al.*, 2011) y los 71 de

algodón, *Gossypium spp* (Park *et al.*, 2010). El tomate cultivado, *Solanum lycopersicum L.*, se sitúa en una posición intermedia con 47 genes anotados (Reuscher *et al.*, 2013), mientras que en *Arabidopsis* existen 35 (Johanson *et al.*, 2001; Quigley *et al.*, 2001).

Las AQP se subdividen en cuatro subfamilias. **Las proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs**, del inglés *Plasma membrane Intrinsic Proteins*) fueron identificadas por primera vez en *Arabidopsis*, pudiendo encontrarse de forma monomérica o dimérica gracias a la unión covalente por enlaces disulfuro (Kammerloher *et al.*, 1994; Bienert *et al.*, 2012). Las PIPs a su vez se clasifican en PIP1 y PIP2, radicando su principal diferencia en que las PIP1 presentan un extremo N-terminal de mayor longitud y un extremo C-terminal y lazo extracelular “A” (Fig.4.1) de menor longitud que los observados en las PIP2 (Chaumont *et al.*, 2001). Esta diferencia estructural les confiere cambios en su funcionalidad que se detallarán más adelante. Ambos tipos se encuentran presentes en el musgo (*Physcomitrella patens*), lo que indica que fueron importantes desde el principio de la evolución de las plantas terrestres (Danielson y Johanson, 2008). Además de estar involucradas en el transporte radial de agua por la vía célula a célula (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2005; Maurel *et al.*, 2008), las PIPs facilitan el transporte de otras moléculas como el CO₂ (Uehlein *et al.*, 2008), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Bienert *et al.*, 2014), glicerol (Biela *et al.*, 1999) y urea (Eckert *et al.*, 1999).

Las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIPs, del inglés *Tonoplast Intrinsic Proteins*), se describieron por primera vez por Maurel *et al.* (1993) y son consideradas como las primeras acuaporinas descubiertas en plantas (Maurel *et al.*, 1993; Daniels *et al.*, 1994). Las proteínas TIPs están involucradas en el intercambio de agua entre el citosol y los compartimentos vacuolares (Maurel *et al.*, 1993), siendo indispensables para el mantenimiento del estatus hídrico intracelular (Tyerman *et al.*, 2002). Hoy en día se conoce que las TIPs también

facilitan el transporte de peróxido de hidrógeno (Bienert *et al.*, 2006), urea (Liu *et al.*, 2003), amonio y amoniaco (Holm *et al.*, 2005).

Las proteínas intrínsecas de membrana similares a la nodulina 26 (NIPs, del inglés *Nodulin 26-like Intrinsic Proteins*) presentan una gran variación entre especies (Rivers *et al.*, 1997). El primero de los miembros descritos de esta subfamilia, la *nodulin-26*, se localiza en los nódulos de la raíz de la soja (Fortin *et al.*, 1987), aunque también están presentes en plantas no leguminosas, como *Arabidopsis* (Takano *et al.*, 2006) o arroz (Ma *et al.*, 2006). Estas AQP_s llevan a cabo un transporte de agua no específico por lo que también pueden transportar glicerol (Bienert *et al.*, 2011), ácido bórico (Takano *et al.*, 2006), silicio (Ma *et al.*, 2006) o arsenito (Meharg y Jardine, 2003).

La familia menos numerosa, está formada por **proteínas intrínsecas pequeñas (SIPs**, del inglés *Small Intrinsic Proteins*) que se localizan en el retículo endoplasmático y pueden transportar de agua (Ishikawa *et al.*, 2005).

Recientemente, se han descrito 3 nuevas subfamilias de AQP_s: las denominadas **proteínas intrínsecas similares a GlpF (GIPs**, del inglés *GlpF-like Intrinsic Proteins*), homólogas a algunos canales de glicerol presentes en las bacterias Gram positivas, **las proteínas intrínsecas híbridas (HIPs**, del inglés *Hybrid Intrinsic Proteins*), cuya similitud a nivel aminoacídico parece relacionarlas con las PIPs y TIPs y la formada por las denominadas **proteínas intrínsecas no categorizadas (XIPs**, del inglés *uncategorized X Intrinsic Proteins*). Hasta la fecha, tanto las GIPs como las HIPs únicamente se han identificado en el musgo, *Physcomitrella patens*, (Gustavsson *et al.*, 2005; Danielson y Johanson, 2008), mientras que las XIPs se han identificado en multitud de especies de plantas a excepción de las monocotiledóneas y *Arabidopsis* (Danielson y Johanson, 2008). En solanáceas, las XIPs parecen presentar funciones redundantes con la subfamilia NIPs, habiéndose descrito permeabilidad al glicerol, a la urea, al amonio y al peróxido de hidrógeno

(Bienert *et al.*, 2011). La identificación de estas nuevas AQP's en musgo sugiere que las plantas ancestrales presentaban 7 subfamilias de AQP's. Mientras que las AQP's pertenecientes a la subfamilias GIP's y HIP's se perdieron en las plantas vasculares. Parece ser que, posteriormente, la subfamilia XIP's se perdió en monocotiledóneas y *Arabidopsis* (Danielson y Johanson, 2008). La pérdida de las XIP's en *Arabidopsis* podría explicarse por la pérdida de genes debido a la reducción del tamaño del genoma (Jonston *et al.*, 2005).

4.1.1.2 Estructura molecular de las AQP's

Las AQP's son proteínas hidrofóbicas que presentan una estructura altamente conservada, con una masa molecular pequeña, que oscila entre los 23 y 35 kDa. Todos los miembros de esta familia presentan seis dominios transmembrana α hélice conectados por 5 lazos (Fig.4.1). Dos de los lazos (B y D) se localizan en el citosol, al igual que los extremos N- y C-terminales, mientras que los lazos A, C y E están ubicados extracelularmente (Fig.4.1A). Algunas AQP's se asocian formando un tetramero en el que cada monómero actúa como un canal funcional, y todas presentan un motivo altamente conservado, el motivo NPA, formado por la secuencia de aminoácidos Asparragina-Prolina-Alanina localizados en los lazos B y E (Fig.4.1B) (Fujiyoshi *et al.*, 2002; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Estos dominios NPA forman α hélices que se introducen en la membrana plasmática dando lugar al poro central de la proteína.

La especificidad del transporte a través de las AQP's se debe a dos zonas de constricción en el interior del poro (región NPA y región Ar/R) que actúan como una barrera de exclusión por tamaño, bloqueando el transporte de moléculas voluminosas. Además permiten el reconocimiento del sustrato mediado por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el interior del poro (Fujiyoshi *et al.*, 2002).

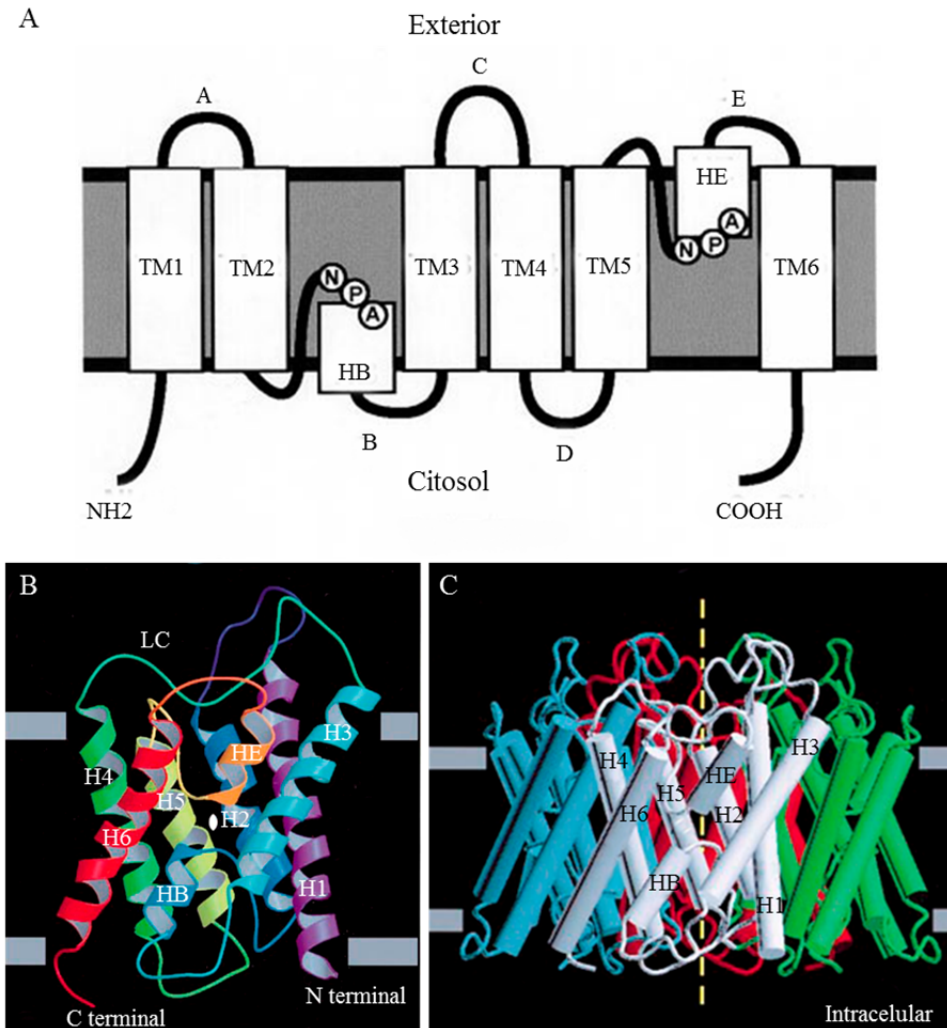


Figura 4.1. Estructura molecular de las AQPs. (A) Modelo de estructura de AQP en el que se observan los principales dominios de la proteína. Los seis dominios transmembrana (TM) se encuentran unidos por cinco dominios helicoidales, tres exteriores (A, C y E) y dos interiores (B y D). Los motivos HB-NPA y HE-NPA, se encuentran en las caras citosólica y extracelular respectivamente. Los extremos N- y C- terminales se hayan ambos en la cara citoplasmática. Esquema tomado de Chaumont *et al.* (2001). (B) Vista lateral de la estructura tridimensional monomérica obtenida por cristalografía de rayos X de la AQP-1/CHIP28 donde se observan los distintos dominios transmembranales así como los dominios helicoidales. (C) Vista lateral del tetrámero AQP1/CHIP28 en el que cada monómero está representado por un color diferente. Cada uno de ellos interactúa con los dos monómeros vecinos por interacciones entre los distintos dominios transmembranales y entre los dominios helicoidales que contribuyen a la estabilidad del tetrámero. Esquema B y C tomado de Murata *et al.* (2000).

La **región NPA**, principal filtro de selectividad, permite el paso de moléculas de agua a modo de hilera. Dichas moléculas muestran una reorientación específica al interactuar con los residuos de asparragina del motivo NPA. Este mecanismo, junto con la presencia de un potencial electrostático positivo previene la translocación de protones (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). La segunda zona de constricción es la conocida como **región Ar/R** (aromática/Arginina) localizada en la apertura extracelular del poro. Esta región, más estrecha que la región NPA, está formada por cuatro residuos aminoacídicos, dos de los cuales se sitúan en las hélices transmembrana 2 (H2) y 5 (H5), mientras que los otros dos se localizan en el lazo E (Wallace y Roberts, 2004). Las propiedades de estos cuatro residuos determinarán la estructura y tamaño del poro, así como los posibles enlaces con las moléculas (Beitz *et al.*, 2006).

4.1.1.3 Regulación de las AQPs

Gracias a la presencia de AQPs, es posible la regulación del flujo de agua entre el medio que rodea a las células y el citosol de las mismas, así como entre el interior de ciertos orgánulos celulares y el citosol de la célula (Luu y Maurel, 2013). Algunas AQPs presentan expresión constitutiva (Johansson *et al.*, 1996), mientras que otras su expresión está regulada por factores ambientales, como la salinidad o la temperatura (Alexandersson *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005; Maurel *et al.*, 2008). Para adaptarse a los frecuentes y, en ocasiones, rápidos cambios ambientales se necesita una regulación de la abundancia y actividad a corto plazo, lo cual tiene lugar mediante la regulación post-traducciona (Vandeleur *et al.*, 2014). Estas modificaciones que pueden incluir fosforilación, metilación, ubiquitinación, formación de puentes disulfuro, glicosilación, heteromerización y protonación, pueden influir en los procesos de localización de las AQPs así como en los procesos de apertura y cierre del poro central (Chaumont y Tyerman, 2014).

Los procesos de heteromerización pueden cambiar la localización subcelular de las AQP. Un ejemplo de ello es el mostrado por Zelazny *et al.* (2009) en protoplastos de maíz en los que la expresión de diversas PIP2 afecta a la localización de las PIP1, almacenadas estas últimas en el retículo endoplasmático en ausencia de las primeras. La co-expresión de PIP2s con PIP1s relocalizan a las últimas en la membrana plasmática. Asimismo, los procesos de heteromerización también están involucrados en la actividad de las AQP. Este hecho fue observado en oocitos de *Xenopus* en los que la expresión de ZmPIP1-2 provocó el aumento a la permeabilidad de solutos como el glicerol o la urea, mientras que si ZmPIP1-2 se co-expresa con ZmPIP2-5 incrementa tanto la cantidad de ZmPIP1-2 en la membrana plasmática de los oocitos así como su permeabilidad al agua (Fetter *et al.*, 2004).

La glicosilación y fosforilación también parecen afectar a la localización de las AQP (Maurel *et al.*, 2008). Por ejemplo, bajo condiciones de salinidad elevada, la PIP2-1 de *Arabidopsis* presenta la serina-283 de su extremo C-terminal no fosforilada, y como consecuencia se produce una acumulación intracelular de la misma mientras que en condiciones normales, la proteína se encuentra fosforilada y mayoritariamente localizada en la membrana plasmática. Esto pone de manifiesto que los procesos de fosforilación en la serina-283 son esenciales para su correcta localización (Prak *et al.*, 2008).

La apertura y cierre del poro central de las AQP están regulados por diversos factores, como la **acidificación citosólica**. Un aumento de la concentración de protones en el citosol afecta a la apertura y cierre del poro de las PIPs (Gerbeau *et al.*, 2002). Cuando la proteína se encuentra en conformación abierta (Fig.4.2A), el lazo D se localiza alejado del lazo B permitiendo el paso de moléculas de agua a modo de hilera. La protonación de residuos de Histidina presentes en el lazo D conlleva a un cambio de conformación y la oclusión del poro (Fig.4.2B) (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). La conformación cerrada se estabiliza mediante la unión de un catión divalente,

que parece ser Ca^{++} , en los ensayos *in vivo* (Frick *et al.*, 2013), conformación que desaparece debido a **procesos de fosforilación** del residuo de Serina (Serina 115) localizado en el lazo B (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Asimismo, la fosforilación en el C-terminal de PIP2-1 también provoca la apertura del poro central de la proteína, siendo esta fosforilación dependiente de las concentraciones citosólicas de calcio (Johansson *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 1998). Numerosas AQPs de plantas están reguladas por procesos de fosforilación, observando procesos similares a los descritos en PIP2-1 de espinaca en NIPs (Guenther *et al.*, 2003) o en TIPs expresados en oocitos (Maurel *et al.*, 1995).

Entre los elementos que regulan los procesos de apertura y cierre del poro se encuentran los inhibidores de las acuaporinas, entre los que destacan el oro (en forma de HAuCl_4), la plata (en forma de AgNO_3) (Niemietz y Tyerman, 2002; Sadok y Sinclair, 2010), las especies reactivas de oxígeno como los radicales hidroxilo (*OH) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Aroca *et al.*, 2005; Ye y Steudle, 2006), aunque el más usado en los experimentos de inhibición del flujo radial es el **cloruro de mercurio (HgCl_2)** (Javot y Maurel, 2002). El HgCl_2 se une preferentemente al grupo tiol (también denominado sulfhidrilo) de los residuos de cisteína adyacentes a las regiones NPA (Daniels *et al.*, 1996) o mediante unión covalente a aquellos residuos de Cisteína cercanos a la apertura del poro, en la región Ar/R (Preston *et al.*, 1993; Hirano *et al.*, 2010). Aunque la mayoría de las AQPs son inhibidas por el HgCl_2 , algunas presentan insensibilidad al mismo ya sea porque dicha proteína carece de los residuos de Cisteína en la posición crítica (Frick *et al.*, 2013) o porque estos no se encuentren expuestos (Jung *et al.*, 1994).

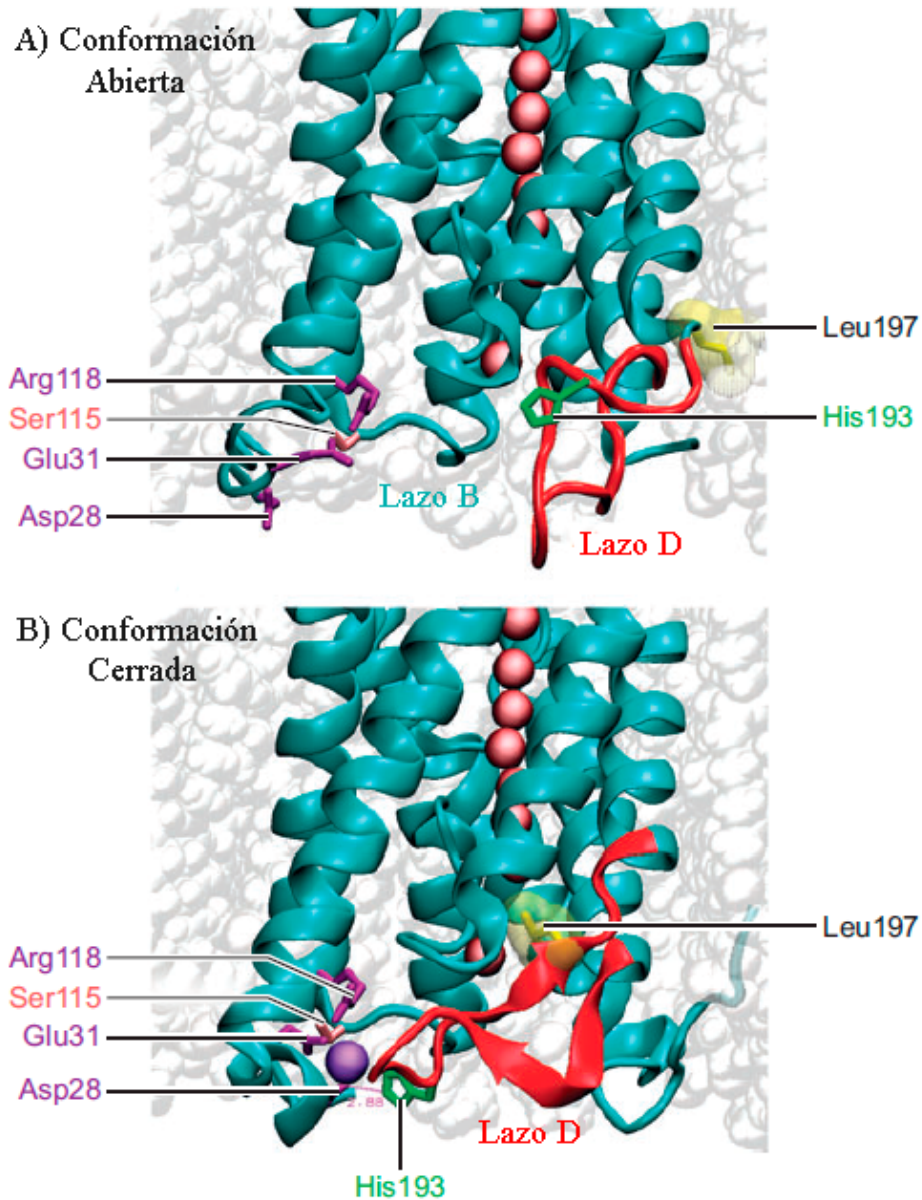


Figura 4.2. Modelo de la estructura de SoPIP2-1 de espinaca (*Spinacia oleracea*). (A) Conformación abierta. Se observa que el residuo de Histidina193 se encuentra desprotonado lo que hace que el lazo D permanezca abierto, permitiendo el paso de moléculas de agua (esferas rojas). (B) Conformación cerrada. La protonación de la Histidina193 provoca el desplazamiento de la cadena de Leucina197. Esta conformación, estabilizada por la presencia de cationes divalentes (esfera morada), impide el paso de las moléculas de agua. Esquema tomado de Maurel *et al.* (2008).

Los efectos del mercurio pueden revertirse mediante la acción de agentes reductores como el β -mercaptoetanol (Preston *et al.*, 1993; Kammerloher *et al.*, 1994) o el ditioneitol (DTT) (Henzler y Steudle, 1995; Javot y Maurel, 2002). Se ha postulado que la inhibición de las AQP por el HgCl_2 no es específica hacia estas proteínas, ya que este compuesto es capaz de reaccionar con todas aquellas proteínas que presenten residuos de Cisteína expuestos (Javot y Maurel, 2002) como por ejemplo proteínas transmembranales implicadas en el transporte de iones (Maurel, 1997; Tyerman *et al.*, 1999). Por otro lado, el cloruro de mercurio también puede presentar un efecto en la actividad citoplasmática y en la integridad de las membranas plasmáticas (Barrowclough *et al.*, 2000). Por tanto, en cualquier estudio de inhibición de AQP en el que se use este compuesto, es necesario confirmar que el efecto en la reducción del flujo de agua es debido a mecanismos de oxidación de las AQP y no consecuencia de un efecto tóxico en la planta.

4.1.1.4 Condiciones ambientales y su efecto en la expresión de AQP

Como se ha comentado anteriormente, la expresión y actividad de las AQP está regulada por multitud de factores ambientales. Entre ellos destacan las condiciones de luz. De este modo, se ha observado que genes pertenecientes a la subfamilia de las PIPs incrementan su expresión en raíces de maíz y vid en periodos de luz (Lopez *et al.*, 2003; Vandeleur *et al.*, 2009; Hachez *et al.*, 2012). Esta respuesta sugiere que el transporte a través de las AQP es mayor durante dichos periodos, mientras que en condiciones de oscuridad esta función se ve disminuida (Takase *et al.*, 2011). Aun así, se han identificado algunas AQP de *Arabidopsis* que son inducidas en oscuridad (Sato-Nara *et al.*, 2004). Otros factores como la salinidad (Alexandersson *et al.*, 2005; Aroca *et al.*, 2005; Boursiac *et al.*, 2005), el déficit hídrico (Johansson *et al.*, 1998), el déficit nutricional en fósforo o nitrógeno (Carvajal *et al.*, 1996), las bajas temperaturas (Lee *et al.*, 2004; Aroca *et al.*, 2005) o las condiciones de anoxia (Liu *et al.*, 2005) producen una disminución en la expresión y/o actividad en la mayoría de

las AQPs de raíz, aunque en algunos casos, como en condiciones de salinidad, también puede producirse un aumento en la expresión de ciertas PIPs (Aroca *et al.*, 2012). Por lo tanto, es difícil asignar una causalidad directa y general entre condiciones de estrés y niveles de expresión de AQPs, haciéndose necesario ampliar dichos conocimientos para intentar dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que provocan la inhibición o expresión de AQPs en cada escenario de cultivo.

4.1.1.5 Las AQPs en el transporte de agua en la raíz

La mayoría de los estudios de inhibición del transporte de agua que se encuentran en la bibliografía se han llevado a cabo con HgCl_2 , y han permitido estimar la contribución de las acuaporinas al flujo radial de agua en la raíz. De este modo, se ha determinado que el cloruro de mercurio produce una disminución de la Lpr que varía entre el 47% en raíces de álamo, *Populus tremuloides* (Wan y Zwiazek, 1999) a más del 80% en raíces de melón, *Cucumis melo* (Carvajal *et al.*, 2000), acelga, *Beta vulgaris* (Amodeo *et al.*, 1999) o arroz, *Oryza sativa* (Sakurai *et al.*, 2008). En tomate, Maggio y Joly (1995) estimaron que esta disminución era del 57%, poniendo de manifiesto que el flujo del agua a través de la vía célula a célula juega un papel fundamental en la captación de la misma en este cultivo.

La contribución de las AQPs a la Lpr también se ha demostrado mediante estudios de genética funcional, usando plantas transgénicas en las que la síntesis de alguna AQP se encuentra disminuida. Plantas de tabaco con el gen *NtAQPI* (ortólogo a *AtPIPI* de Arabidopsis) silenciado presentan una clara disminución de Lpr (Siefritz *et al.*, 2002). No obstante, debido a que las AQPs en plantas forman una gran familia multigénica, puede presentarse compensación de la función por genes parálogos (Javot *et al.*, 2003; Beebo *et al.*, 2009; Chaumont y Tyerman, 2014). Estos mecanismos de compensación podrían explicar los resultados obtenidos por Kaldenhoff *et al.* (1998) en los que tras obtener plantas

de *Arabidopsis* con el gen *AtPIP1b* silenciado mediante antisentido, no se observó una disminución en la capacidad de transporte de agua por parte de la planta.

Tal y como se comentó anteriormente, la mayoría de las AQPs presentan capacidad para transportar agua. Daniels *et al.* (1994) observaron que la expresión de algunos miembros de las PIPs y de las TIPs en las membranas de oocitos de *Xenopus* (que no tienen vacuolas) provocan un aumento en la permeabilidad al agua de los mismos. Estudios posteriores de expresión de AQPs en levaduras (que sí presentan vacuolas) permitieron la correcta localización subcelular de estas proteínas en la membrana plasmática y la membrana del tonoplasto respectivamente (Suga y Maeshima, 2004). La resolución de la estructura atómica de las AQPs permitió dilucidar que las PIPs exhiben un poro altamente conservado y con gran actividad para el transporte selectivo de agua, mientras en las TIPs la configuración del poro es mucho más diversa, haciéndolas permeables a un mayor número de solutos (Maurel, 2007). Por otra parte, se ha observado que dentro de las PIPs, son las PIP2 aquellas que presentan una mayor capacidad para transportar agua mientras que las PIP1 presentan baja capacidad e incluso se encuentran a menudo inactivas (Johansson *et al.*, 1998; Biela *et al.*, 1999; Chaumont *et al.*, 2000). Esta diferencia en la capacidad para transportar agua se ha relacionado con los procesos de heteromerización ya mencionados. Algunos autores han apuntado que la función del transporte de otros solutos como el CO₂, glicerol y urea podría recaer en las PIP1 (Biela *et al.*, 1999; Eckert *et al.*, 1999; Suga y Maeshima, 2004).

Algunas AQPs presentan una expresión diferencial con respecto al tejido. Hay isoformas de PIPs que presentan una elevada expresión en raíz, como es el caso de *AtPIP2-2* de *Arabidopsis* (Javot *et al.*, 2003), *ZmPIP1-1*, *ZmPIP1-5*, *ZmPIP2-1* y *ZmPIP2-5* de maíz (Chaumont *et al.*, 2001), o *NtAQP1* de tabaco (ortóloga a *PIP1* de *Arabidopsis*) (Siefritz *et al.*, 2002). Otras isoformas, como la *AtPIP2-6* de *Arabidopsis* (Prak *et al.*, 2008), la *ZmPIP2-7* y la *ZmPIP1-6* de

maíz (Chaumont *et al.*, 2001) no se detectan en dicho tejido (Prak *et al.*, 2008). La ubicación dentro de la raíz también puede condicionar la expresión de las AQP. En maíz se ha observado que la zona cercana al ápice (0-10 mm) presenta niveles de expresión menores con respecto a las zonas más maduras (50-60 mm), donde se localizan barreras apoplásticas. De este modo, el incremento en los niveles de expresión en las zonas más maduras de la raíz puede atribuirse a la necesidad de facilitar el transporte de agua radial (Hachez *et al.*, 2006). Por el contrario, en raíces de arroz y de vid se ha registrado una mayor expresión de AQP. cercanas al ápice, correlacionándose estos niveles con una mayor Lpr (Sakurai *et al.*, 2008; Gambetta *et al.*, 2013).

Se han identificado mayores niveles de expresión de diversas isoformas de PIPs y TIPs en la exodermis y endodermis, poniendo de manifiesto la importancia de estas AQP. en el flujo de agua desde la superficie de la raíz hacia el córtex y desde el córtex hacia el cilindro vascular, respectivamente (Sakurai *et al.*, 2008). Asimismo, también se han identificado altos niveles de expresión en las células del córtex potenciando de este modo el movimiento de agua transcelular e intracelular y en los vasos xilemáticos (Otto y Kaldenhoff, 2000; Sakurai *et al.*, 2008; Vandeleur *et al.*, 2014). Como ya se ha mencionado, además de las acuaporinas, las barreras apoplásticas juegan un papel fundamental en el flujo radial del agua en la raíz (Bramley *et al.*, 2009) debido a que limitan dicho flujo a través de la vía apoplástica (Schreiber *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2001).

4.1.2 Biopolímeros de barrera en la raíz: suberina y lignina.

Mientras que las AQP. pueden regular el flujo de agua por la vía transcelular de una forma altamente dinámica, la existencia de biopolímeros de barrera en ciertas zonas de la raíz ejerce una regulación más estática de dicho flujo, tanto por la vía transcelular como por la vía apoplástica (Gambetta *et al.*, 2013; Geldner, 2013b). En la raíz, dichos biopolímeros se depositan fundamentalmente

formando las bandas de Caspary (lignina) y la denominada *suberin lamellae* (suberina) (Naseer *et al.*, 2012; Nawrath *et al.*, 2013).

4.1.2.1 Composición química y localización

La **lignina** es un biopolímero estructuralmente complejo y químicamente variable derivado de la polimerización oxidativa de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Campbell y Sederoff, 1996). En la raíz, la lignina se ha identificado formando parte de los vasos xilemáticos (Zeier y Schreiber, 1997), en la pared celular de la endodermis en desarrollo terciario de la mayoría de las monocotiledóneas y ciertas dicotiledóneas (Zeier *et al.*, 1999) y en la banda de Caspary (Naseer *et al.*, 2012), cuya composición en los últimos años está generando una gran controversia. En un principio se postuló que las bandas de Caspary eran estructuras fundamentalmente suberificadas (Espelie y Kolattukudy, 1979), aunque posteriormente se vio que además contenían lignina (Reinhardt y Rost, 1995; Schreiber, 1996). Recientemente, se ha demostrado que las bandas de Caspary en *Arabidopsis* son estructuras formadas por lignina, sin la presencia de suberina (Naseer *et al.*, 2012). Las bandas de Caspary se localizan tanto en las paredes celulares anticlinales de la endodermis, donde forman punteaduras, como en la exodermis (Perumalla *et al.*, 1990; Schreiber *et al.*, 1999; Enstone *et al.*, 2003) donde se extiende a lo largo de toda la pared anticlinal (Schreiber *et al.*, 1999; Geldner, 2013b). En la endodermis primaria los depósitos de lignina pueden observarse próximos al ápice de la raíz mientras que en la exodermis dichos depósitos se encuentran más alejados (Perumalla y Peterson, 1986; Thomas *et al.*, 2007).

La **suberina** se ha descrito como un heteropolímero compuesto por un dominio alifático y un dominio aromático (Zeier y Schreiber, 1997; Bernards, 2002; Franke *et al.*, 2009). El dominio alifático está formado por un poliéster de glicerol, ácidos grasos de cadena larga, ácidos α y ω dioicos, ácidos ω -hidroxi y ácidos hidroxicinámicos esterificados. El domino aromático o similar a la

lignina, asociado a la pared celular, consiste en uniones covalentes entre ácidos hidroxicinámicos y la matriz derivada de alcoholes hidroxicinámicos (Zeier y Schreiber, 1997; Schreiber *et al.*, 1999). Recientemente se ha propuesto que la suberina es un polímero formado únicamente por el dominio alifático, al que en algunas ocasiones se le une lignina. Esta propuesta se basa en estudios sobre la endodermis de *Arabidopsis*, donde se ha observado la formación independiente del dominio alifático cuando la ruta de síntesis de la lignina está suprimida (dominio aromático) (Naseer *et al.*, 2012). Este poliéster complejo, altamente hidrofóbico y resistente a la degradación tanto química como enzimática (Geldner, 2013b), se localiza en la endodermis y/o exodermis, formando la *suberin lamellae* alrededor de la célula (Schreiber *et al.*, 1999), con la excepción de aquellas zonas ocupadas por los plasmodesmos (Enstone *et al.*, 2003). Se ha descrito la existencia de células que carecen de depósitos de suberina, las denominadas células de paso, que en la endodermis se localizan cercanas a los polos del protoxilema (Peterson *et al.*, 1993; Hose *et al.*, 2001; Enstone *et al.*, 2003; Naseer *et al.*, 2012).

Los depósitos de suberina parecen no ser exclusivos de la pared celular secundaria de la endodermis y exodermis, ya que se han identificado impregnaciones de suberina, denominadas suberina difusa, en las paredes primarias de las células epidérmicas de raíces de cebolla (Peterson *et al.*, 1978). La función principal de esta suberina difusa sería la de actuar como una barrera inicial al ataque de patógenos (Thomas *et al.*, 2007).

4.1.2.2 Función en el transporte de agua

Se ha descrito que las deposiciones de lignina y suberina en la endodermis y/o exodermis pueden ejercer una regulación del flujo radial de agua en la raíz (Perumalla *et al.*, 1990; Enstone *et al.*, 2003), debido a sus características hidrofóbicas que hace que actúen como una barrera frente al movimiento del agua (Schreiber *et al.*, 1999).

La lignina presente en las bandas de Caspary ejerce como barrera apoplástica al movimiento de agua e iones (Cholewa, 2000; Enstone *et al.*, 2003; Ma y Peterson, 2003; Geldner, 2013a), forzando estos flujos a través de la vía simplástica (plasmodesmos) y transcelular (AQPs) tanto en la endodermis (Geldner, 2013b) como en la exodermis (Peterson, 1988).

En la endodermis, la formación de los depósitos de suberina que tienen lugar durante el desarrollo secundario de la misma, provoca un bloqueo o disminución en el transporte de agua e iones en la vía de transporte transcelular hacia el interior del cilindro vascular. En esta situación, donde tanto el apoplasto como la vía transcelular se encuentran bloqueadas por los depósitos de lignina y suberina, el flujo de agua es forzado a la vía simplástica (plasmodesmos) (Geldner, 2013b). La presencia de las células de paso, que ofrecen una menor resistencia al flujo radial del agua hacia el interior del anillo vascular (Peterson y Enstone, 1996), disminuye en zonas de la raíz más desarrolladas y distantes al ápice (Enstone *et al.*, 2003).

En la exodermis, la *suberin lamellae* se desarrolla durante o inmediatamente después de la formación de las bandas de Caspary (Ma y Peterson, 2001), provocando una disminución en la absorción de agua e iones (Enstone *et al.*, 2003; Baxter *et al.*, 2009). En condiciones desfavorables de crecimiento, los depósitos de suberina en la exodermis actúan como barrera a la pérdida de agua, iones y oxígeno (Hose *et al.*, 2001; De Simone *et al.*, 2003). Estos depósitos, también puede actuar como barrera física a la penetración de hongos (Thomas *et al.*, 2007) o incluso permitir el almacenamiento del ácido abscísico en el apoplasto del córtex (Hose *et al.*, 2001).

Al igual que la expresión de las AQPs, la deposición de suberina está regulada por las condiciones ambientales. Estas condiciones pueden influir en el grado de suberificación y por tanto afectar al flujo radial de agua. Por ejemplo, en condiciones de salinidad (Reinhardt y Rost, 1995) o deficiencias de magnesio

(Pozuelo *et al.*, 1984) se intensifica la suberificación de endodermis y exodermis de maíz, siendo esta deposición más cercana al ápice de la raíz. El caso contrario se observó en condiciones de deficiencia de nitrógeno en que las raíces de ricino (*Ricinus communis*) disminuyeron su grado de suberificación lo cual incrementa la absorción de nitrógeno (Schreiber *et al.*, 2007).

Ninguno de los parámetros de desarrollo de la raíz de tomate analizados en este trabajo de tesis explica de forma directa la alta variabilidad presente en los valores de Lpr. A lo largo de esta introducción, se ha puesto de manifiesto que la presencia de AQPs y la deposición de biopolímeros de barrera en ciertas zonas de la raíz, pueden afectar al flujo radial de agua de la misma. Por ello, en el presente capítulo se decidió estudiar la expresión y actividad de dichas proteínas en los dos genotipos parentales y en las 13 líneas RILs seleccionadas. Por otro lado, se realizó un estudio preliminar de la deposición de biopolímeros de barrera (fundamentalmente suberina) en una zona concreta de la raíz en los dos genotipos parentales y en dos líneas RILs seleccionadas por sus diferencias en los valores de Lpr (RILs 65 y 121).

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

El material vegetal y las condiciones de cultivo utilizadas para los estudios descritos en este capítulo fueron los mismos que los empleados para la determinación de la Lpr a 21 DDG, que ya fueron descritos en el capítulo 2 de la presente memoria (ver página 81).

4.2.2. Tratamiento de las raíces con HgCl_2 y DTT

Se utilizaron de 10 a 20 plantas por genotipo (21 DDG) y tras eliminar la parte aérea de cada una, las raíces (cortando 3-4 cm por encima desde donde empieza la raíz propiamente dicha) se incubaron durante 5 min en una solución de HgCl_2 (50 μM). Tras un posterior lavado con agua destilada durante 2 min, se procedió a determinar la Lpr mediante la técnica de libre exudado tal y como se hizo en el capítulo 2 (ver página 82) con la diferencia de que el avance del exudado en el interior del capilar se registró a intervalos de tiempo de 10 min, durante un periodo máximo de 3 h hasta obtener 20 μl de dicho exudado.

Para revertir el efecto producido por el HgCl_2 , las raíces se incubaron en una solución de DTT (5mM) durante 15 min después de someterlas al mismo tratamiento con HgCl_2 (5 min a 50 μM y posterior lavado con agua destilada). Se utilizaron de 10 a 18 plantas por genotipo y al igual que en el caso anterior se determinó Lpr para cada raíz y tratamiento.

4.2.3. Identificación *in silico* de genes de acuaporinas de tomate (*S. lycopersicum*).

La identificación *in silico* de los genes de AQPs presentes en *Solanum lycopersicum* se realizó mediante una primera búsqueda de genes candidatos usando como palabras clave “aquaporin” y/o “water channel” en la base de datos de *Sol Genomics Network* (SGN, www.solgenomics.net). Asimismo, con la

secuencias aminoacídicas de AQPs descritas en otras especies como *Arabidopsis* (Johanson *et al.*, 2001; Quigley *et al.*, 2001) y maíz (Chaumont *et al.*, 2001) se realizó una búsqueda por homología mediante BLAST, para poder identificar candidatos en la base de datos SGN que no incluyesen en su descripción las palabras clave usadas.

4.2.4. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético de las AQPs

La secuenciación del genoma completo de tomate en el año 2012 (The Tomato Genome Consortium, 2012) permitió identificar un total de 47 genes de AQPs (Reuscher *et al.*, 2013). Con las secuencias de aminoácidos de estos genes (en formato FASTA), se procedió a realizar un alineamiento múltiple de secuencias con CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Para evitar aquellas regiones ricas en huecos (gaps), se especificó la penalización de la apertura y de la extensión de huecos en 10 y 0,1, respectivamente. El alineamiento múltiple resultante fue analizado manualmente para eliminar aquellas columnas que presentaran un 50% de huecos (Volkita *et al.*, 2011).

El árbol filogenético se construyó usando el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013) mediante el método del vecino más próximo (*Neighbor-Joining*) (Saitou y Nei, 1987). Con este método la matriz de distancia se calculó mediante el modelo evolutivo Jones-Taylor-Thornton. Se realizó el test de *bootstrap* con 1025 repeticiones para comprobar la fiabilidad estadística de las diferentes ramas generadas, teniendo en cuenta los huecos (*pairwise deletion*) (Volkita *et al.*, 2011).

4.2.5. Aislamiento y purificación de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se muestreó la raíz completa de 4 plantas por genotipo a la misma hora en la que se realizaron las medidas de Lpr (primera hora de la mañana, tras el periodo de oscuridad). Este pool de muestras fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido. El aislamiento de ARN se realizó a partir de 100 mg de tejido, triturado en nitrógeno líquido, utilizando el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Por último, se procedió a la cuantificación del ARN mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). La calidad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

La síntesis de ADNc a partir de ARN total se llevó a cabo usando el kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis Super MIX para qRT-PCR (Invitrogen). En él, la síntesis de ADNc se realiza partiendo de 1 µg de ARN total y usando oligos(dT)₂₀ y hexámeros al azar. Finalizado este proceso, las muestras de ADNc se diluyeron añadiendo agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 100 µl, siendo este ADNc diluido el utilizado en la PCR cuantitativa a tiempo real.

4.2.6. Análisis de expresión de AQP_s mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Real Time qPCR)

Una vez identificadas las PIPs que presentaban una mayor expresión en raíz, se procedió al diseño de las parejas de cebadores correspondientes (Tabla 4.1). Para ello, se utilizó la herramienta Primer-BLAST tomando como molde el ARN mensajero (ARNm) que aparece asociado a cada gen en la base de datos de *Sol Genomics Network* (www.solgenomics.net). Por último, se comprobó tanto la especificidad de las parejas de cebadores como su temperatura óptima de

anillamiento (62°C) tras realizar una PCR en ADN genómico de hojas jóvenes en los genotipos parentales a tres temperaturas diferentes (55°C, 58°C o 62°C).

Tabla 4.1. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y qRT-PCR, identificando el gen amplificado y tamaño en pares de bases del amplicón obtenido usando ADNc como molde. CD: cebador directo (5' - 3'). CR: cebador reverso (5' - 3').

Gen		Cebador (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>SIPIP1-1</i> (Solyc08g008050)	CD	AGGGATTTCATGCAAGGTCCG	150
	CR	TTCTCTTGGCATCAGTGGCG	
<i>SIPIP1-2</i> (Solyc01g094690)	CD	TACAGGCACCGGCATTAACC	109
	CR	TCCAATGAATGGTCCCACCC	
<i>SIPIP2-4</i> (Solyc06g011350)	CD	TCAATGGTGACAAGGCGTGG	89
	CR	AAACTGGTGGTAGAAGGCCG	
<i>SIPIP2-5</i> (Solyc10g084120)	CD	GGTGCTAATGAACTTGCTGTTGG	119
	CR	CTGGCATTCTCTTGGGATCG	
<i>SICAC</i> (Solyc08g006960)	CD	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	173
	CR	TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado en dos réplicas biológicas para lo que se usó la mezcla comercial SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara) con las cantidades que se especifican a continuación. En un volumen total de 20 µl: 10 µl SYBR® Premix Ex Taq™ (2X), 0,4 µl del cebador directo (0,1 µM en los 20 µl) (Tabla 4.1), 0,4 µl del cebador reverso (0,1 µM en los 20 µl) (Tabla 4.1), 1,6 µl del ADNc molde (< 100 ng) y 7,6 µl de agua destilada. La RT-qPCR se llevó a cabo en un termociclador CFX96™ *Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD) empleando las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C durante 30 s, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 s y anillamiento a 62°C durante 20 s. En cada ciclo se registró la fluorescencia de la muestra al final de la fase de anillamiento. Se continuó con un ciclo a 95°C durante 10 s, seguido del registro de la curva de

melting que se realiza incrementando la temperatura en pasos de 0,5°C durante 5 s cada paso, desde 65°C hasta 95°C y registrando la fluorescencia después de los 5 s.

La cantidad del transcrito del gen problema se relativizó al gen de expresión constitutiva *SICAC* (Solyc08g006960) (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008). Una vez obtenidos los valores de amplificación se procedió al análisis de los resultados utilizando el programa CFX-Manager versión 3.1. (BioRad). Para cada genotipo se realizó una normalización de los valores de Cq del gen de interés con respecto a los valores de Cq del gen de referencia mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta Cq = Cq \text{ gen interés} - Cq \text{ gen referencia} \quad (15)$$

A continuación, se obtuvo la cuantificación relativa con respecto al gen de referencia (*Fold Change*, FC) mediante la siguiente fórmula:

$$FC = 2^{-\Delta Cq} \quad (16)$$

4.2.7. Localización de depósitos de lignina y suberina

La deposición de lignina y suberina se llevó a cabo en los genotipos parentales y en las líneas RIL 65 (alta Lpr) y RIL 121 (baja Lpr). Para ello se analizaron cortes transversales a mano alzada en la raíz principal de 2 a 5 plantas por genotipo. Las plantas tenían la misma edad (21 DDG) que aquellas utilizadas para la determinación de la Lpr. La raíz principal presentó una longitud que osciló desde los $10,4 \pm 1,1$ cm en MM, RIL 65 y RIL 121 a los $24,2 \pm 2,5$ cm en TO-937. Los cortes transversales se hicieron en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz primaria, dado que es en las zonas más distales al ápice donde la exodermis y endodermis están más desarrolladas (Barrowclough *et al.*, 2000; Martre *et al.*, 2001).

Para la observación de las bandas de Caspary (depósitos de lignina) se realizó una tinción con Auramina O (Sigma Aldrich) al 0,01% (p/v) a temperatura ambiente durante 1 min e inmediata observación bajo luz ultravioleta (luz de excitación ~400nm) (Dalla Vecchia *et al.*, 1999).

La observación de los depósitos de suberina se realizó gracias a la tinción del dominio alifático con Fluorol Yellow 088 (Sigma Aldrich) al 0,01 % (p/v) en ácido láctico, a 70°C durante 30 min. Tras 3 lavados de 5 min cada uno con agua destilada, se realizó el contraste de los cortes transversales con Azul de Anilina al 0,5% (p/v) a temperatura ambiente durante 30 min. Esta tinción de contraste permite a su vez una reducción de la autofluorescencia. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con agua destilada (Lux *et al.*, 2005). La visualización de los cortes transversales tras la tinción se realizó en un microscopio confocal (Leica SP5 HyD) con láser de excitación de 488 nm y rango de emisión de 500-600 nm. Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal fueron analizadas con el programa ImageJ (versión 1.48: <http://imagej.nih.gov/ij/>).

4.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático SPSS versión 18 mediante el mismo procedimiento descrito en el capítulo 2 (ver página 88).

4.2.3. Resultados

4.3.1 Acuaporinas

4.3.1.1 Inhibición del transporte mediado por acuaporinas: efecto del HgCl_2

Para discernir entre el transporte de agua que tiene lugar a través de los canales de agua formados por las acuaporinas y la que fluye por el apoplasto se decidió tratar con HgCl_2 las raíces de las líneas parentales y las RILs seleccionadas. Debido al efecto inhibitor del HgCl_2 sobre la mayoría de las AQP, la reducción en los valores de Lpr tras el tratamiento con mercurio podría ser indicativo de la proporción total de agua que fluye a través de las AQP (Fig.4.3). Esta Lpr “ HgCl_2 ” fue comparada con aquella obtenida en raíces que no se sometieron a ningún tipo de tratamiento (Lpr control, valores obtenidos en el capítulo 2). En la mayoría de los genotipos, el tratamiento de HgCl_2 redujo los valores de Lpr en más de un 60%, con excepción de la RIL 121 donde la reducción fue de un 42%. En 8 de las líneas tratadas (RIL 68, 175, 2, 38, 66, 65, 59 y TO-937) esta reducción en los valores de Lpr superó el 80% (Fig.4.3).

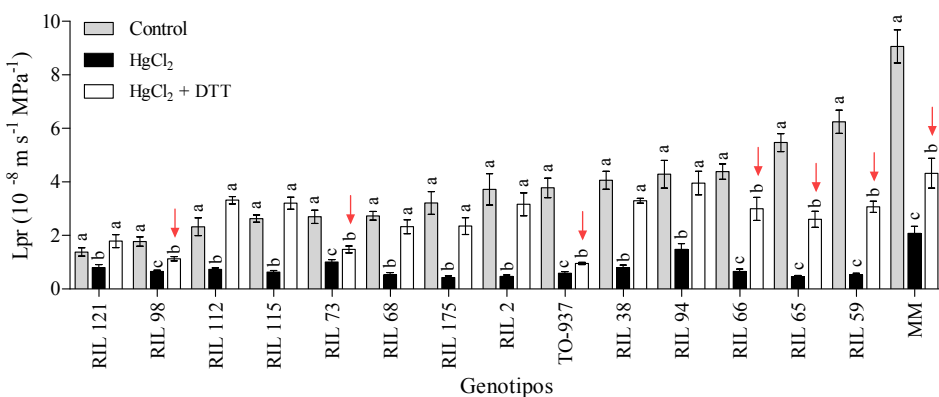


Figura 4.3. Conductividad hidráulica en raíces (Lpr) en respuesta al HgCl_2 . A los 21 DDG se calculó la Lpr en base a la superficie de la raíz en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas con tres tratamientos diferentes: Lpr “control” en el que las raíces no se sometieron a ningún tipo de tratamiento ($n = 11-43$ plantas por genotipo), Lpr “ HgCl_2 ” tras el tratamiento durante 5 min con HgCl_2 al $50\mu\text{M}$ ($n = 10-20$ plantas por genotipo) y Lpr “ $\text{HgCl}_2 + \text{DTT}$ ” tras el tratamiento de 5 min con HgCl_2 al $50\mu\text{M}$ seguido de 15 min con DTT al 50mM ($n = 11-18$ plantas por genotipo). Datos representados como media \pm SE. Dentro de cada

genotipo, las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni). Las flechas rojas indican las líneas cuya Lpr no recuperó el valor control tras el tratamiento con DTT.

Como se ha comentado anteriormente, la acción del mercurio puede no ser específica frente a las AQP, siendo necesario confirmar que la reducción observada en los valores de Lpr no es consecuencia de un efecto tóxico del tratamiento. Para ello se analizó la capacidad de revertir el efecto del mercurio tratando posteriormente las plantas con DTT y midiendo de nuevo la Lpr. En la figura 4.3 se puede observar cómo el tratamiento con DTT indujo un aumento significativo en los valores de Lpr (Lpr “HgCl₂+DTT”) en todos los genotipos analizados. Sin embargo, la recuperación no fue igual en todos ellos, variando desde el 30% en RIL 73 a más de un 80% en las RILs 115, 175, 2, 65 y 59. Tras el tratamiento con DTT se observó que en 8 de los genotipos (RIL 121, 112, 115, 68, 175, 2, 38 y 94) la Lpr de recuperación alcanzó valores similares a los obtenidos en las plantas control. En los genotipos restantes (RIL 98, 73, 66, 65, 59 y los dos genotipos parentales) a pesar de que la Lpr aumentó tras el tratamiento con DTT, se alcanzaron valores inferiores a los obtenidos en las plantas control (Fig. 4.3), lo que indicó que la recuperación no fue total en estos casos.

El posible efecto tóxico que el HgCl₂ pudiera estar causando en otras proteínas transmembranales involucradas en el transporte de iones se evaluó mediante el análisis del potencial osmótico registrado en el exudado de savia recogido en las plantas control y en las plantas tratadas con mercurio. En 9 genotipos (RIL 73, 68, 112, 38, 115, 175, 121 y los 2 genotipos parentales) de los 15 estudiados, el tratamiento con HgCl₂ no afectó de forma significativa al potencial osmótico de la savia recogida por libre exudado, obteniendo valores de potencial osmótico similares a los registrados en las plantas control (Fig.4.4). Sin embargo, 5 líneas (RIL 2, 59, 65, 66 y 98) presentaron incrementos significativos en este parámetro que oscila entre un 14% para la RIL 98 y un 34% para la RIL 66, mientras que la RIL 94 registró una disminución del 21%.

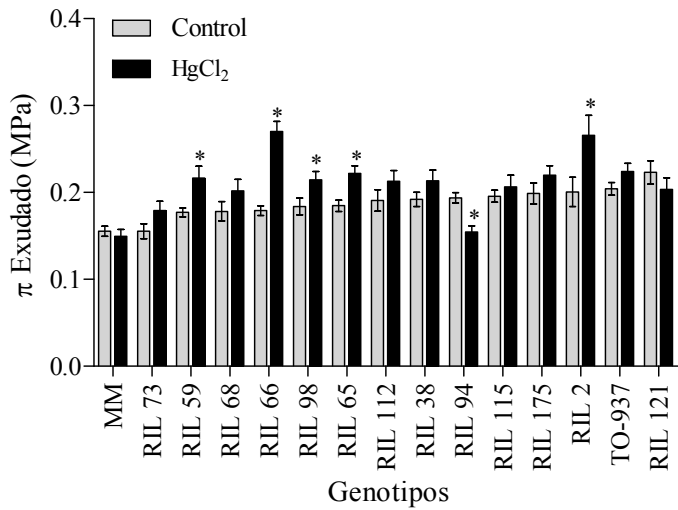


Figura 4.4. Potencial osmótico del exudado en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas tratadas y sin tratar con HgCl₂ a los 21 DDG. Datos representados como media \pm SE. n = 11-43 plantas por genotipo para el control y n = 10-20 plantas por genotipo para el tratamiento con HgCl₂. Las diferencias significativas entre tratamientos se marcan con un asterisco (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

4.3.1.2 Identificación *in silico* de acuaporinas de tomate y clasificación filogenética

La primera búsqueda de AQP's presentes en el genoma de *Solanum lycopersicum* llevada a cabo en base al nombre con el que estas proteínas están anotadas, “aquaporin” o “water channel” dio como resultado un total de 50 loci candidatos. Este número era superior al obtenido por Sade *et al.* (2009), que fueron capaces de identificar 37 posibles genes de AQP's en tomate. Teniendo en cuenta la similitud entre las secuencias de aminoácidos de las diferentes AQP's descritas en otras especies con los loci susceptibles de codificar AQP's mediante la herramienta BLAST y la identificación de AQP's realizada por Reuscher *et al.* (2013), se actualizó la primera identificación de AQP's realizada, lo que redujo el número inicial a un total de 47 genes de AQP's.

La nomenclatura para las AQP's sigue la propuesta por Reuscher *et al.* (2013) basada tanto en la realizada por Sade *et al.* (2009) en tomate como en aquella

usada en otras especies. De este modo, los 47 genes identificados en tomate se agrupan conformando las diferentes subfamilias con 14 genes PIPs, 6 genes XIPs, 11 genes TIPs, 12 genes NIPs y 4 genes SIPs, que tras el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos y su posterior análisis filogenético dieron como resultado el árbol filogenético que se muestra en la figura 4.5, que coincide por el propuesto por Reuscher *et al.* (2013). Dentro de cada subfamilia, se distinguen distintos grupos filogenéticos: 2 grupos en las PIPs y SIPs, 5 grupos en las TIPs y hasta 7 grupos en las NIPs.

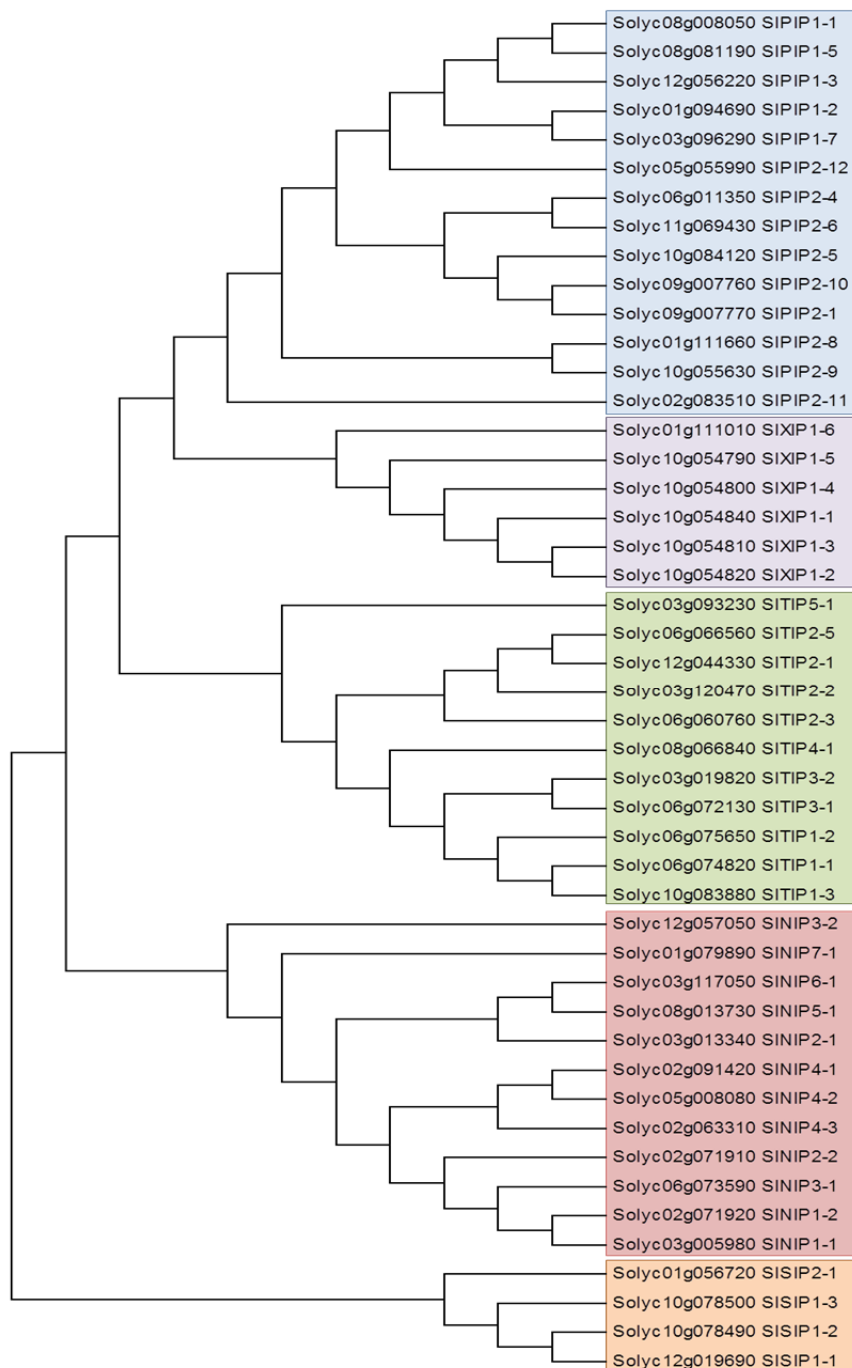


Figura 4.5. Árbol filogenético de las 47 AQP identificadas en tomate obtenido mediante el método del vecino más próximo (*Neighbor-Joining*) derivado de un alineamiento múltiple con CLUSTAL-W de las secuencias de aminoácidos de las 47 AQP identificadas en tomate.

4.3.1.3 Cuantificación de la expresión relativa de genes PIP

Con idea de centrar el estudio de la expresión relativa en aquellas PIPs cuya expresión fuese mayoritaria en las raíces con respecto a la parte aérea, se usaron los datos de expresión depositados en la base de datos *Tomato Functional Genomics* (TFG) procedentes del análisis transcriptómico mediante RNAseq en el cultivar Heinz 1706 llevados a cabo por Siling Zhong como parte del proyecto de secuenciación del genoma de tomate (The Tomato Genome Consortium, 2012). Este análisis permitió obtener los niveles de expresión en hoja y en raíz (RPKM) de los 14 genes *PIP* presentes en tomate. A partir de estos datos se calculó la ratio de los niveles de expresión entre raíz y hoja de dichos genes. Se observa que *SlPIP1-7*, *SlPIP2-12* y *SlPIP2-8* presentan mayores niveles de expresión en hoja con respecto a raíz, mientras que *SlPIP2-11* no muestra expresión en estos tejidos. Por otro lado, de los genes PIPs que muestran mayor nivel de expresión en raíz, destacan 4 de ellos, presentando una expresión 8 veces (*SlPIP1-2*), 140 veces (*SlPIP2-4*), 800 veces (*SlPIP1-1*) y 2400 veces (*SlPIP2-5*) mayor en raíz que en hoja (Fig.4.6).

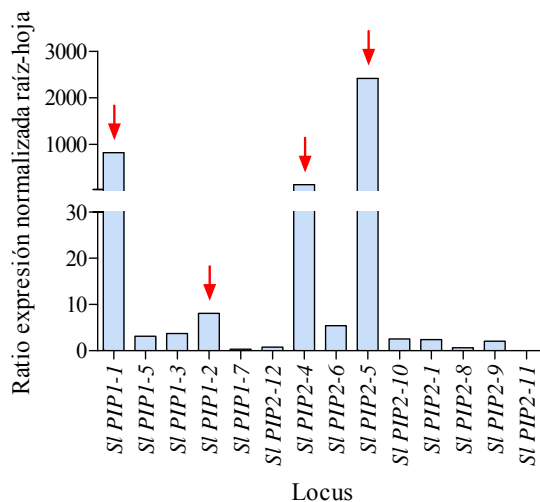


Figura 4.6. Ratio de la expresión normalizada entre raíz y hoja de los 14 genes PIP identificados en *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706. Los datos de expresión se obtuvieron de la base de datos *Tomato Functional Genomics* (<http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/TFGD/digital/experiment.cgi?ID=D004>). Las flechas rojas indican los genes seleccionados para los posteriores análisis mediante *real time* RT-qPCR.

Tras la selección de estos 4 genes se cuantificó el ARNm de cada uno de ellos en la raíz de los distintos genotipos mediante *real time* RT-qPCR (Fig.4.7). La cuantificación mostró una variabilidad significativa entre los genotipos analizados para los 4 genes (*SIPIP1-1*, *SIPIP1-2*, *SIPIP2-4* y *SIPIP2-5*). Asimismo, se observó una mayor cantidad relativa de ARNm para los genes PIP2 que para los PIP1 (Fig.4.7).

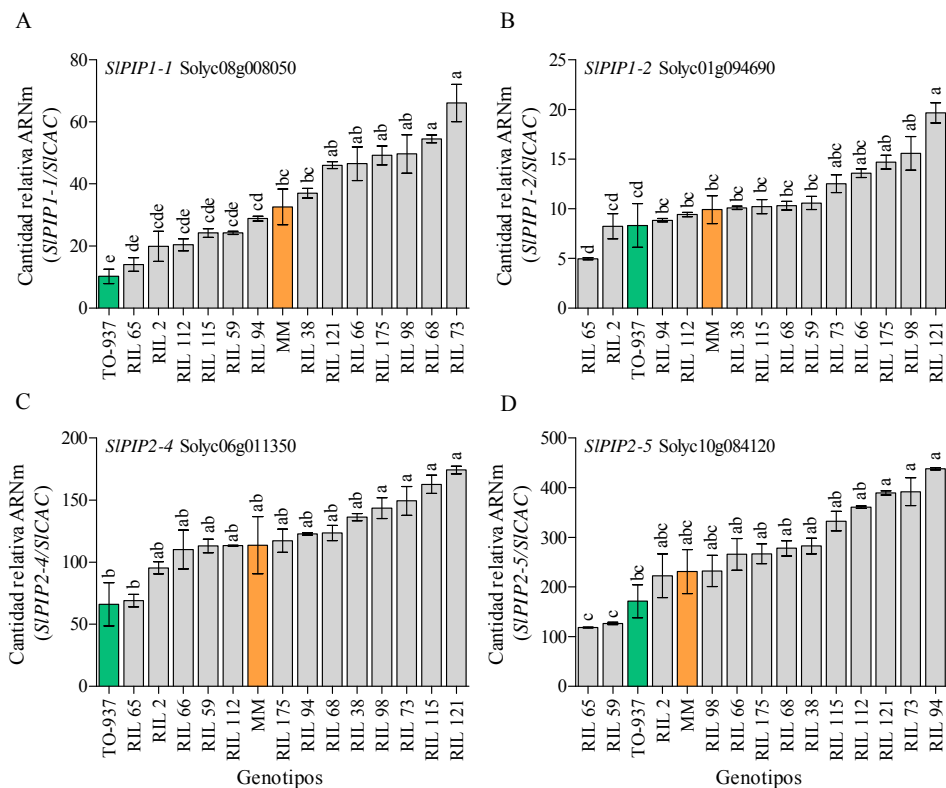


Figura 4.7. Cantidad relativa de ARNm de 4 PIPs con respecto al gen de referencia (*SICAC*, Solyc08g006960) en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en las 13 líneas RILs seleccionadas a los 21 DDG. Datos representados como media \pm SE. $n = 2-4$ réplicas por genotipo. Diferencias significativas entre los valores están expresadas por las distintas letras (GLM, $p \leq 0,05$ con corrección de Bonferroni).

En relación a *SIPIP1-1* (Solyc08g008050) se observó que las líneas RILs 73 y 68 registraron niveles de mensajero superiores a los observados en las líneas parentales (en torno a un 83% más con respecto a TO-937 y un 47% más con respecto a MM). El parental doméstico MM presentó 3,3 veces más transcrito

que TO-937 (Fig. 4.7A). Por otro lado, *SIP1-2* (Soly01g094690) mostró una expresión relativa cuyo valor difirió hasta en 4 veces entre los genotipos analizados, siendo el valor mostrado por la RIL 121 el más elevado ($19,6 \pm 1,0$) mientras que la RIL 65 registró el menor ($4,9 \pm 0,1$). No se observaron diferencias significativas entre los parentales ($10,0 \pm 1,1$ y $8,3 \pm 2,2$ para MM y TO-937 respectivamente), lo que supuso una expresión de *SIP1-2* en las líneas parentales en torno a un 50% menor con respecto a la línea de mayor expresión, la RIL 121 (Fig.4.7B).

Las cantidades relativas de ARNm de *SIP2-4* (Soly06g011350) mostraron unas diferencias significativas del 57% entre los distintos genotipos, siendo los de las líneas RILs 121, 115, 73 y 98 los valores medios más elevados oscilando entre $174,3 \pm 3,0$ para la RIL 121 y $143,5 \pm 8,3$ para la RIL 98, mientras que la RIL 65 y TO-937 presentaron los menores, con valores de $69,0 \pm 5,0$ y $66,1 \pm 17,5$, respectivamente (Fig.4.7C). Por último, las cantidades relativas de mensajero de *SIP2-5* (Soly10g084120) fueron aproximadamente un 70% superior en las líneas RILs 94, 73 y 121 con respecto a las registradas en las RILs 65 y 59 (Fig.4.7D). Tanto para *SIP2-4* como para *SIP2-5* no se registraron diferencias significativas entre los genotipos parentales.

4.3.2 Análisis histológico de los depósitos de biopolímeros de barrera

4.3.2.1 Análisis histológico de la lignina

En los primeros 20 mm de la zona basal (que corresponde a una distancia al ápice de la raíz principal de 22-24 cm para TO-937 y de 8-10 cm para MM, RIL 65 y RIL 121), las secciones transversales observadas usando el microscopio de campo claro presentaron un desarrollo secundario en el que se podía distinguir la zona del córtex así como el anillo central vascular (Fig.4.8/ Fig.4.9). Debido al grosor de la sección transversal y como consecuencia la falta de contraste, no fue posible observar las bandas de Caspary presentes en la endodermis (Fig. 4.8A-B/ Fig.4.9A-B). En cambio, la emisión de fluorescencia tras la tinción con

Auramina O permitió discernir las bandas de Caspary como puntos localizados en la pared radial y anticlinal de las células que conforman la endodermis (Fig.4.8E-F/Fig.4.9E-F). Esta tinción permitió visualizar sólo los vasos del metaxilema (Fig.4.8C-D-E-F/Fig.4.9C-D-E-F). Por otro lado, se observó en los genotipos parentales y en las líneas RILs 65 y 121, que la capa de células que conforman la exodermis también mostró una tinción positiva al reaccionar con la Auramina O (Fig.4.8C-D-E-F/Fig.4.9C-D-E-F). Sin embargo, a pesar de que la Auramina O presenta una alta afinidad por la lignina (Perdih y Perdih, 2011), también se ha descrito que este colorante presenta afinidad por la parte aromática de la suberina (Dalla Vecchia *et al.*, 1999), haciendo imposible determinar mediante el uso de esta tinción si los depósitos observados en la exodermis están formados por lignina, suberina o ambos compuestos. Para ello, se procedió a la tinción de cortes transversales, efectuados en la misma zona de la raíz principal con Fluorol Yellow, un colorante que permite la correcta detección de la suberina (Lux *et al.*, 2005; Naseer *et al.*, 2012).

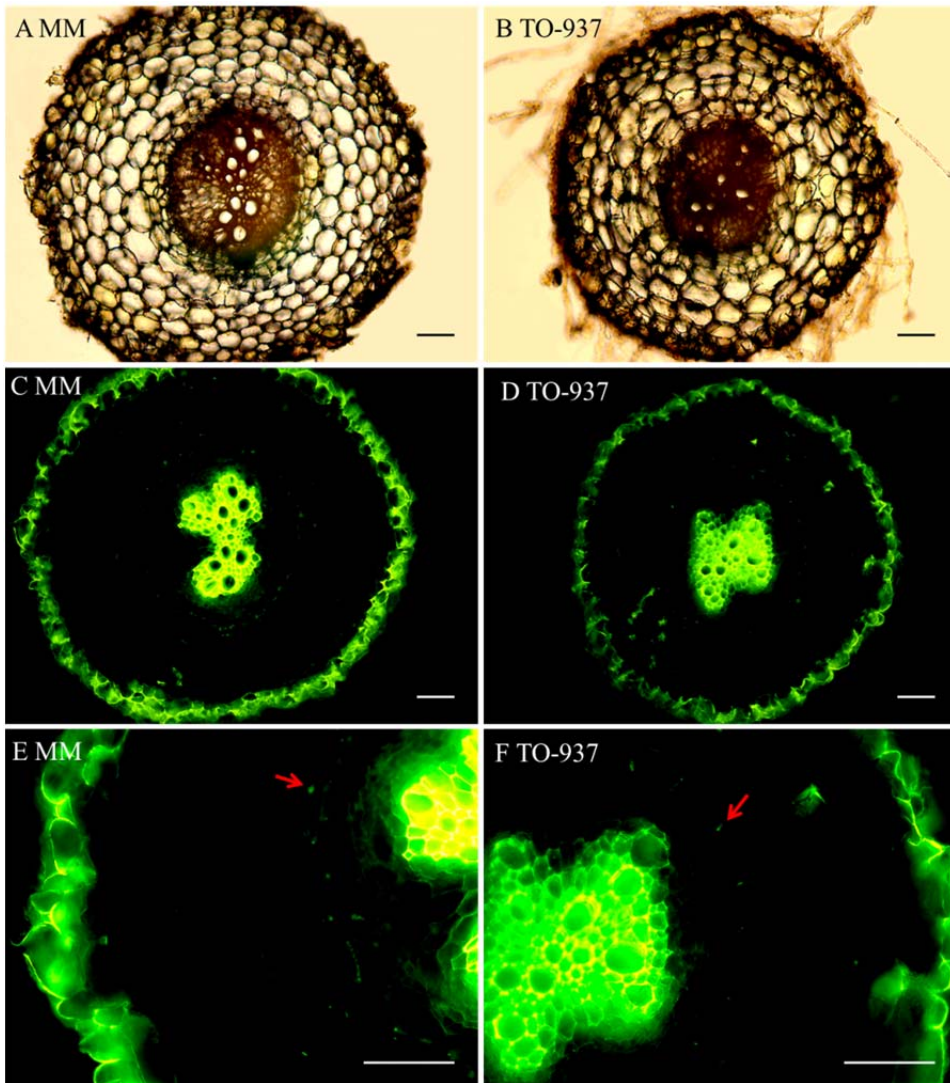


Figura 4.8. Tinción con Auramina O. Las secciones transversales de raíces en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz primaria se realizaron a mano alzada ($\sim 0,3$ mm de grosor) en los dos genotipos parentales (MM y TO-937). Los cortes se tiñeron con Auramina O (0,01% p/v). (A-B) Visualización con un microscopio de campo claro y (C-D-E-F) epifluorescencia excitando con luz ultravioleta. $n = 2$ plantas por genotipo. Barra equivale a $100 \mu\text{m}$. Las flechas rojas señalan las bandas de Casparry presentes en la endodermis.

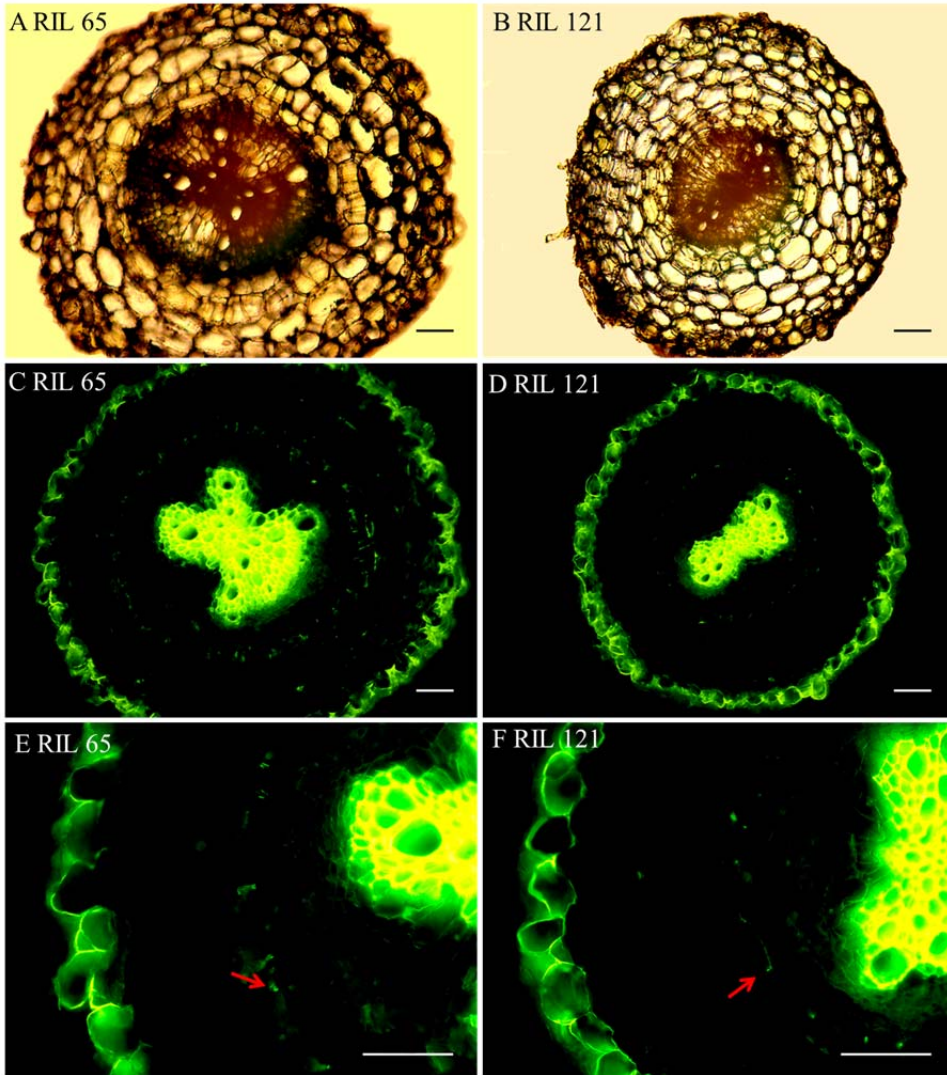


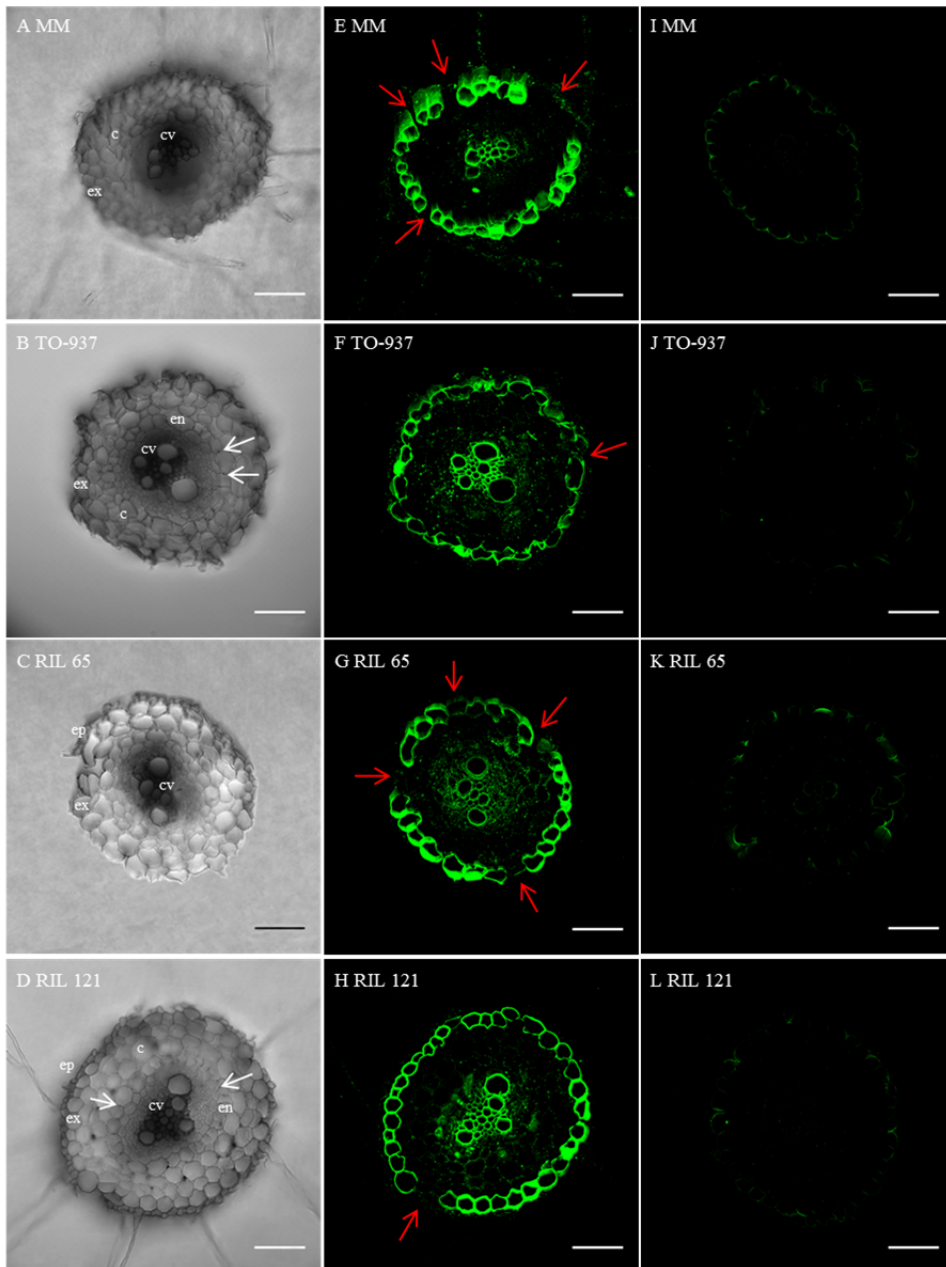
Figura 4.9. Tinción con Auramina O. Las secciones transversales de raíces en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz primaria se realizaron a mano alzada (~ 0,3 mm de grosor) en dos líneas RILs seleccionadas por sus diferencias en Lpr (RIL 65 y RIL 121). Los cortes se tiñeron con Auramina O (0,01% p/v). (A-B) Visualización con un microscopio de campo claro y (C-D-E-F) epifluorescencia excitando con luz ultravioleta. n = 2 plantas por genotipo. Barra equivale a 100 μ m. Las flechas rojas señalan las bandas de Casparry presentes en la endodermis.

4.3.2.2 Análisis histológico de la suberina

Las secciones transversales teñidas con Fluorol Yellow se analizaron mediante microscopía confocal bajo luz transmitida (Fig.4.10A-B-C-D), lo que permitió observar, en algunas de las secciones, las punteaduras que conforman las bandas de Caspary en la pared radial de las células endodérmicas (Fig.4.10B y D). Por tanto, en estas secciones, fue posible distinguir todas las capas celulares que conforman la raíz en la zona basal de la misma, desde la epidermis hasta el cilindro vascular central (Fig.4.10D). Como control de la tinción con Fluorol Yellow, se observó la autofluorescencia presente en las distintas secciones, la cual fue prácticamente nula en todos los cortes analizados (Fig. 4.10I-J-K-L). La posterior tinción con Fluorol Yellow y contraste con Azul de Anilina mostró una exodermis suberificada en la zona de estudio en los cuatro genotipos analizados. Esta deposición de suberina cubría toda la superficie de la mayor parte de las células que conforman la exodermis, a excepción de algunas células individuales que no mostraron tinción, y que probablemente corresponden con las células de paso. Cabe destacar que fue en el parental doméstico MM donde se observó un mayor número de células de paso (Fig. 4.10E), seguido por la RIL 65 (Fig. 4.10G). Por el contrario, el parental silvestre TO-937 fue el que presentó el menor número de células de paso (Fig. 4.10F), seguido de la RIL 121 (Fig. 4.10H).

En relación a la endodermis, no se detectó la presencia de suberina en las paredes anticlinales y radiales de las células. Por otro lado, a pesar de que la tinción con Fluorol Yellow permite la correcta detección de suberina, se observó una tinción de los vasos xilemáticos en todas las secciones transversales analizadas (Fig. 4.10E-F-G-H).

Figura 4.10. Tinción con Fluorol Yellow. Secciones transversales en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz primaria realizados a mano alzada (~ 0,3 mm de grosor) en los dos genotipos parentales (MM y TO-937) y en dos líneas RILs seleccionadas por sus diferencias en Lpr (RIL 65 y RIL 121).



Continuación figura 4.10. Los cortes se tiñeron con Fluorol Yellow 088 al 0,01% (p/v) y contrastados con Azul de Anilina al 0,5% (p/v). (A-B-G-H) Visualización con un microscopio confocal con luz transmitida y (C-D-I-J) con láser de excitación 488 nm y luz de emisión de 500-600 nm.

El estudio histológico preliminar presentado mostró que la deposición de la suberina no fue homogénea a lo largo de la longitud de la zona estudiada ya que, dentro de una misma planta, los cortes transversales (realizados de manera seriada en los primeros 20 mm de la raíz principal) presentaron un patrón de deposición de suberina diferencial, siendo más acusadas estas diferencias en el parental doméstico MM (Fig.4.11A-B). Las líneas RIL 65 (Fig.4.11E-F) y RIL 121 (Fig.4.11G-H) mostraron una menor diferencia en el número de células de paso que la existente entre las secciones transversales efectuadas en la raíz principal de MM. Por último, en el parental TO-937 apenas se observaron diferencias entre las secciones realizadas en la exodermis de las secciones realizadas, mostrando el menor número células de paso (Fig.4.11C-D).

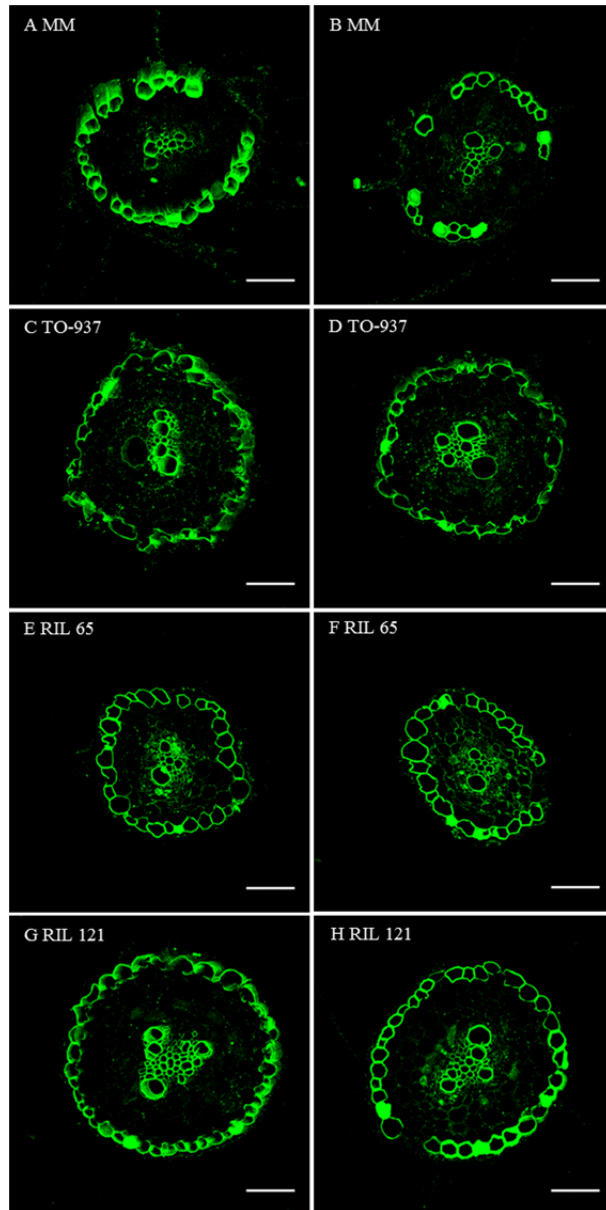


Figura 4.11. Tinción con Fluorol Yellow 088 que muestra una deposición de la suberina no continúa a lo largo de la longitud de la raíz. Secciones transversales en los genotipos parentales (MM y TO-937) y en dos líneas RIL seleccionadas (RIL 65 y RIL 121) pertenecientes a la misma planta. Se muestran dos cortes seriados realizados a mano alzada (~ 0,3 mm de grosor) en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz primaria. Los cortes se tiñeron con Fluorol Yellow 088 al 0,01% (p/v) y contrastados con Azul de Anilina al 0,5% (p/v). Visualización con un microscopio confocal con láser de excitación 488 nm y luz de emisión de 500-600 nm. n = 3-5 plantas por genotipo. Barra equivale a 100 μ m.

4.4. Discusión

4.4.1 Acuaporinas

Está ampliamente documentado que existe una relación entre la expresión de acuaporinas y los cambios en la permeabilidad al agua que se produce en las membranas celulares, ejerciéndose de esta forma una regulación sobre la capacidad de captación de agua por parte de la raíz y afectando así a los valores de Lpr (Maurel, 1997; Javot y Maurel, 2002; Tyerman *et al.*, 2002). De todas las AQP's conocidas, se ha descrito que son las pertenecientes a la subfamilia PIP las que tienen una mayor implicación en el transporte de agua a través de la membrana plasmática, debido a su estructura molecular y a su localización en las membranas citoplasmáticas (Tyerman *et al.*, 1999; Maurel *et al.*, 2002; Maurel, 2007).

El uso de mercurio para inhibir de forma reversible la actividad de las acuaporinas en plantas (Maggio y Joly, 1995; Niemietz y Tyerman, 1997) ha sido y sigue siendo ampliamente utilizado para demostrar la existencia de estas proteínas (Chrispeels y Maurel, 1994), y para determinar la vía predominante del movimiento de agua en la raíz (Carvajal *et al.*, 2000). Estudios en diferentes especies vegetales evidencian que la inhibición de las AQP's con HgCl₂ se manifiesta en una disminución en los valores de Lpr (Carvajal *et al.*, 1996; Carvajal *et al.*, 1999; Wan y Zwiazek, 1999; Zhang y Tyerman, 1999). Cuando esta disminución supone más de un 70% puede asumirse que el transporte de agua radial se da principalmente a través de estos canales (Tazawa *et al.*, 1997). En el caso del tomate, hay evidencias de la implicación de las AQP's en el transporte de agua, ya que un tratamiento con mercurio (500 μ M) durante 30 min conduce a una reducción de un 50% en los valores de Lpr (Maggio y Joly, 1995). Sin embargo, debido a que el mercurio puede ser tóxico para los tejidos, causando efectos indirectos en el metabolismo (Zhang y Tyerman, 1999), la dosis y el tiempo de exposición pueden ser críticos (Barrowclough *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que tanto las raíces de las líneas RILs como las de los genotipos parentales estudiados presentan alta sensibilidad al HgCl_2 (Fig.4.3), ya que un tratamiento de menor tiempo y concentración, al usado por Maggio y Joly (1995) conllevó una disminución en la Lpr de entre un 42 y un 80%. Estos resultados confirman la importancia que tienen las AQP's en el transporte de agua radial en las raíces de tomate. No obstante, el efecto del HgCl_2 no es igual de acentuado en todas las líneas estudiadas; mientras que la RIL 121 presenta una disminución del 42% (la menor de todas), las RILs 68, 175, 2, 38, 66, 65, 59 y el parental TO-937 presentaron una disminución de más del 80% (Fig.4.3). Esto evidencia la existencia de otros factores, independientemente de los canales bloqueados por el HgCl_2 , que influyen en la captación de agua por parte de las raíces.

Un indicador de la toxicidad debida al tratamiento con mercurio es el efecto que los tratamientos con agentes reductores, como el DTT, tienen sobre la reversibilidad de la acción del metal (Barrowclough *et al.*, 2000). La comparación del potencial osmótico del exudado de savia en raíces sin tratar y tratadas con mercurio (Fig.4.4), mostró que en 6 líneas (RILs 38, 175, 68, 115, 112 y 121) los valores del potencial osmótico del exudado no diferían entre aquellas raíces tratadas y sin tratar con mercurio. Además, en estas líneas el efecto del mercurio sobre las AQP's pudo revertirse tras el tratamiento con DTT, poniendo de manifiesto que la inhibición de las AQP's que se registró en las líneas referidas no incluye un efecto tóxico asociado al tratamiento con mercurio. En estas líneas RILs, el flujo de agua a través de la vía célula a célula, puesto de manifiesto mediante el bloqueo con HgCl_2 , supuso entre el 69 y el 87% de los valores de Lpr, a excepción de la RIL 121 donde este flujo fue del 42%. Estos porcentajes de inhibición de la Lpr por tratamiento con mercurio están en concordancia con aquellos obtenidos en otras especies vegetales como cebolla, brócoli o *Arabidopsis* (Barrowclough *et al.*, 2000; Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Boursiac *et al.*, 2005; López-Pérez *et al.*, 2007), donde el transporte de

agua a través de AQP_s en la raíz supone entre el 60 y el 90%. En este punto, cabe recordar que el tratamiento con mercurio inhibe la actividad de la mayoría de las AQP_s pero no de todas, ya que algunas de ellas son insensibles al mismo (Daniels *et al.*, 1996), por lo que la contribución de estos canales al flujo radial de agua en las líneas RIL_s de tomate evaluadas podría ser incluso mayor. El estudio de otros inhibidores como el H₂O₂, que presenta un mecanismo de acción diferente al mercurio, induciendo la internalización de las AQP_s (Boursiac *et al.*, 2008) o incluso mediante el bloqueo de los canales por el aumento del Ca⁺⁺ intracelular derivado de una activación de los canales de calcio (Gerbeau *et al.*, 2002; Ye y Steudle, 2006), podría arrojar más luz sobre este proceso. En raíces seminales de cebada, tanto el uso del H₂O₂ como el del HgCl₂ presentan resultados similares con la ventaja de que el H₂O₂ es menos tóxico que el HgCl₂ (Knipfer, 2010).

Las líneas RIL_s 59, 65, 66 y 98 tratadas con mercurio mostraron diferencias con respecto a los controles (no tratadas) en el potencial osmótico del exudado. Además, la aplicación del DTT tras el tratamiento de mercurio no provocó que la Lpr alcanzara de nuevo los valores controles (no tratadas). Ambas respuestas parecen indicar que en estas líneas el mercurio pudo tener un efecto tóxico. En relación a los dos genotipos parentales y la RIL 73, los valores de Lpr tras el tratamiento con HgCl₂ seguido de la aplicación del DTT, no llegaron a mostrar los valores que alcanzaban estas mismas líneas sin tratar. Al igual que en el caso anterior, este tipo de respuesta sugiere que existe una toxicidad debida al tratamiento con mercurio. Sin embargo, en estas líneas se observaron valores similares del potencial osmótico del exudado entre los tratamientos, lo que podría estar indicando que la inhibición de las AQP_s era mayor, pudiendo necesitar un mayor tiempo de exposición al agente reductor (DTT) para conseguir que el efecto del mercurio pudiera revertirse completamente.

Por último, en las líneas RIL 2 y 94 se observó el efecto contrario, a pesar de mostrar la reversibilidad en los valores de Lpr tras ser tratadas con DTT, los

valores del potencial osmótico del exudado de savia fueron diferentes entre las raíces tratadas con mercurio y las no tratadas, manifestando un claro efecto tóxico del tratamiento con mercurio en estas líneas. En las RILs 2, 59, 65, 66 y 98, el mayor potencial osmótico registrado en el exudado de savia podría estar relacionado con un posible efecto tóxico del tratamiento de mercurio sobre la integridad de las membranas celulares. Esto podría haber provocado la liberación del contenido vacuolar y un aumento concomitante del potencial osmótico. En el caso de la RIL 94, el menor potencial osmótico del exudado de savia podría relacionarse con un posible papel inhibidor del mercurio sobre los transportadores de membrana. Por tanto, en todas estas 9 líneas RILs (MM, TO-937, RIL 2, 59, 65, 66, 73, 94 y 98) el tratamiento de mercurio parece estar afectando no sólo a proteínas de membrana implicadas en el transporte de agua, sino también a la actividad citoplasmática y/o a la integridad de las membranas plasmáticas (Barrowclough *et al.*, 2000). En estas líneas sería necesario el uso de otros inhibidores de la actividad de AQPs menos tóxicos que el mercurio, como el H_2O_2 mencionado anteriormente, o realizar un estudio para determinar el tiempo óptimo de incubación en el que se pueda observar el efecto inhibidor del mercurio sin tener su efecto tóxico.

Otro método utilizado por diversos autores para intentar discernir cuál es la vía predominante en el movimiento radial del agua en la raíz consiste en determinar el flujo de agua por apoplasto mediante el uso de colorantes como el *Light Green*, cuyo tamaño molecular permite su movimiento únicamente por el apoplasto. El procedimiento se lleva a cabo incubando las raíces aún unidas a la parte aérea de la planta durante 15 min en solución nutritiva a la que se añade el colorante a una concentración determinada ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$). Tras la incubación, se elimina la parte aérea de la planta para obtener el exudado ya sea aplicando una presión positiva mediante el uso de la cámara de Scholander o bajo gradiente de presión osmótico (libre exudado). La diferencia de concentración de dicho colorante (medido por espectrofotometría) entre la solución nutritiva y el

exudado de la raíz corresponderá al porcentaje de agua a través de la vía apoplástica (López-Pérez *et al.*, 2007). A pesar de los diversos intentos llevados a cabo durante la elaboración de este trabajo de tesis para conseguir una estimación del flujo por apoplasto mediante la técnica de libre exudado, los valores de absorbancia obtenidos en el exudado estaban siempre por debajo del límite de detección inferior del espectrofotómetro. Esta baja concentración del colorante en el exudado, parecía indicar que la mayor parte del movimiento del flujo de agua en estos genotipos de tomate tenía lugar por la vía célula a célula, corroborando los resultados obtenidos con la inhibición de las AQP por el mercurio.

Los experimentos de inhibición de las AQPs demostraron la implicación de dichas proteínas en el transporte radial de agua. Las AQPs forman una gran familia multigénica (Fig4.5) habiéndose descrito que las pertenecientes a la subfamilia PIPs son las que presentan una mayor implicación en dicho transporte (Maurel, 2007). Reuscher *et al.* (2013) identificaron diversas PIPs de tomate, entre las que se encuentra la SIPIP2-4, cuyo gen presenta expresión en todos los tejidos analizados (raíz, tallo, hoja y fruto), indicando un posible papel constitutivo en los procesos de transporte de agua en la planta. En su trabajo, los autores no detectaron expresión en ninguno de los tejidos analizados para la SIPIP2-5, pero sí una expresión dinámica en el desarrollo del fruto para SIPIP1-1 y SIPIP1-2, indicando un posible papel diferencial de las mismas durante el desarrollo del fruto. Estos resultados contradicen los obtenidos por The Tomato Genome Consortium (2012) y depositados en la base de datos *Tomato Functional Genomics* (Fig4.6), donde SIPIP2-4, SIPIP1-1 y SIPIP1-2 presentaron una mayor expresión relativa en raíz con respecto al resto de tejidos de la planta (incluidos frutos y hojas), y SIPIP2-5 presentó un alto nivel de expresión en raíz pero no el resto de tejidos analizados. Esta discrepancia podría deberse a diferencias en el escenario de cultivo, a la variedad utilizada en cada experimentación, o a diferencias en el estado fenológico de la planta, puesto que

los niveles de expresión de las AQP_s pueden estar regulados por todos estos factores (Maurel *et al.*, 2008).

El transporte de agua suele asociarse a la actividad de la subfamilia PIP₂, dado que la expresión de algunas isoformas pertenecientes a esta subfamilia en oocitos de *Xenopus* incrementaban la permeabilidad de la membrana mientras que las proteínas de la subfamilia PIP₁ presentaban baja o ninguna actividad (Kammerloher *et al.*, 1994; Chaumont *et al.*, 2000). Esta falta de actividad de las PIP₁ se ha asociado a que estas AQP_s presentan una mayor capacidad para el transporte de otras sustancias o bien a que necesitan de una co-expresión con proteína PIP₂ para alcanzar la membrana plasmática (Chaumont *et al.*, 2000). La mayor cantidad relativa de ARNm de PIP₂ con respecto a PIP₁ presentes en la raíz de los distintos genotipos estudiados en el presente trabajo, parecen indicar que en tomate las PIP₂ también pudieran presentar una mayor relevancia en el transporte radial de agua en la raíz.

La cuantificación relativa de la expresión de las 4 PIP_s seleccionadas en este trabajo mostró una alta variabilidad entre los distintos genotipos analizados (Fig.4.7). A pesar de que diversos estudios han mostrado una estrecha correlación entre los niveles de expresión de AQP_s y los valores de Lpr (Martre *et al.*, 2001; Almeida-Rodriguez *et al.*, 2011; Hachez *et al.*, 2012), los resultados obtenidos en este trabajo muestran que líneas RILs que presentaron los menores valores de Lpr (RILs 121 y 98) (Fig.4.3, Lpr control), registraron una alta expresión relativa de los 4 genes estudiados. Podría ocurrir que las modificaciones post-traduccionales ejercieran una inhibición en la actividad de las AQP_s (Chaumont y Tyerman, 2014). Por tanto, a pesar de la elevada cantidad de ARNm observada para las distintas PIP_s estudiadas, para las RILs 121 y 98, la proteína producida pudiera no ser funcional en su totalidad, lo que haría además que el tratamiento con HgCl₂ tuviera un menor efecto (un 42% y un 63%, respectivamente). Este tipo de respuesta se ha observado en otras especies, como el melón, donde la falta de funcionalidad de las AQP_s se asoció

con menores valores de reducción tras el tratamiento con mercurio (Carvajal *et al.*, 2000). Asimismo, los menores valores de reducción de Lpr tras dicho tratamiento también podrían asociarse a una mayor cantidad de AQP_s insensibles al mismo (Daniels *et al.*, 1996) o a la presencia de una exodermis más desarrollada que pudiera estar afectando a la libre difusión del mercurio. En esta situación, habría un número de células que no se verían afectadas por el tratamiento de mercurio produciendo una menor reducción en los valores de Lpr (Barrowclough *et al.*, 2000). Por tanto, el desarrollo de la exodermis en la RIL 121 también podría estar afectando a la libre difusión del mercurio lo que resultó en una baja reducción de Lpr en la RIL 121.

Relacionar diferencias en los valores de Lpr basados en la cantidad relativa de ARNm de las PIP1 y PIP2 es arriesgado, debido a que las modificaciones post-traduccionales (principalmente fosforilaciones) pueden llevar a encontrar una falta de correlación entre estas cantidades y los niveles de proteínas (Muries *et al.*, 2013). Podría ocurrir que las diferencias observadas en los valores de Lpr estuvieran correlacionadas positivamente con los niveles de proteínas de las distintas PIPs, más que con las cantidades relativas de ARNm. Para poder comprobar esto sería necesario llevar a cabo un estudio en profundidad de las distintas PIPs a nivel de proteína (acumulación/estabilidad, localización, actividad,...).

Una última explicación pudiera estar relacionada con los procesos de heteromerización que son requeridos en algunas isoformas de la subfamilia PIP1 y PIP2 para la correcta ubicación en las membranas plasmáticas y para la funcionalidad en el transporte de agua (Fetter *et al.*, 2004). Un ejemplo claro es el aumento observado en la permeabilidad de membrana cuando diversas isoformas de álamo (*PtPIP2-4* y *PtPIP1-1*) se co-expresan en oocitos de *Xenopus* (Secchi y Zwieniecki, 2010). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron esta respuesta ya que la RIL 115 y el parental silvestre TO-937 que presentaron los mayores ratios entre las cantidades relativas de ARNm de

SIPIP2-4 y *SIPIP1-1* (ratio igual a 6,7 y 6,4 respectivamente), no mostraron valores de Lpr elevados.

4.4.2 Depósitos de biopolímeros de barrera

La deposición de lignina y de suberina en la endodermis y/o exodermis puede afectar a la capacidad de absorción de las raíces (Zimmermann y Steudle, 1998; Zhang y Tyerman, 1999; Schreiber, 2010). En algunas especies, como maíz, se ha determinado una disminución en la Lpr que se ha relacionado con el desarrollo de la exodermis (Freundl *et al.*, 2000; Steudle, 2000; Gambetta *et al.*, 2013). Sin embargo, en otras especies, como cebolla, no se ha encontrado una clara relación entre los depósitos de estos biopolímeros en ambas capas celulares y la disminución en Lpr (Barrowclough *et al.*, 2000).

Todas las raíces presentan bandas de Caspary en las paredes anticlinales de la endodermis (Reinhardt y Rost, 1995; Enstone *et al.*, 2003), las cuales se encuentran incrustadas por lignina (Naseer *et al.*, 2012). A pesar de que la formación de estas bandas depende de diversos factores (especie, edad, o condiciones de cultivo), generalmente se desarrollan dentro de los primeros 10 mm del ápice radicular (Enstone *et al.*, 2003). En la presente tesis, se observaron las bandas de Caspary en la endodermis de las secciones transversales obtenidas de la zona basal de la raíz y expuestas a la tinción con Auramina O (Fig.4.8/Fig.4.9), mientras que con la tinción de Fluorol Yellow, tinción de suberina (Lux *et al.*, 2005), no se observaron dichas estructuras (Fig.4.10). Asimismo, el análisis de las secciones transversales obtenidas a 15 mm del ápice (capítulo 3) también permitió la observación de estas bandas de Caspary en las líneas RILs y en los 2 genotipos parentales. Los resultados obtenidos parecen indicar que a pesar de que las bandas de Caspary suponen una barrera apoplástica al movimiento de agua hacia el cilindro vascular (Perumalla *et al.*, 1990), su presencia en todos los genotipos analizados no explicaría las diferencias observadas en Lpr. Sin embargo, estos resultados están basados

únicamente en pruebas histológicas preliminares. Para confirmar estos resultados sería necesario realizar un estudio más pormenorizado de histología a lo largo de toda la raíz con cortes seriados a distintas distancias del ápice que permitiera confirmar los resultados obtenidos en este capítulo, así como delimitar la zona de elongación (ápice), la zona de maduración y la zona de crecimiento secundario presentes en la raíz de tomate de una forma precisa. Además, hoy en día y gracias a estudios realizados en *Arabidopsis*, se están descubriendo las bases moleculares implicadas en la diferenciación de la endodermis. De este modo se han identificado proteínas específicas, las llamadas CASPs, que son cruciales para la correcta formación de las bandas de Caspary (Roppolo *et al.*, 2011). Estos avances abren la puerta hacia un estudio molecular de la diferenciación de la endodermis en especies como tomate. La obtención de plantas de tomate deficientes en la expresión de los genes CASPs sería una gran herramienta para estudiar en profundidad la relación entre las bandas de Caspary y la Lpr.

Dependiendo del estado de desarrollo de la raíz, la endodermis puede avanzar en su diferenciación hacia una endodermis secundaria (Enstone *et al.*, 2003; Knipfer y Fricke, 2014), que tiene un efecto considerable en la Lpr, ya que la deposición de suberina que puede tener lugar en esta fase, supone la interrupción del movimiento del agua a través de la vía transcelular (Geldner, 2013b). Generalmente, esta deposición de suberina se produce a unos 100-250 mm del ápice (Zimmermann *et al.*, 2000; Krishnamurthy *et al.*, 2009). Según esto, en nuestro estudio histológico se esperaba observar la formación de una endodermis secundaria en los cortes obtenidos en la zona basal de la raíz primaria (80-100 mm desde el ápice para MM, RIL 65 y RIL 121 y 220-240 mm para TO-937). Sin embargo, con la tinción específica de Fluorol Yellow no se visualizaron depósitos de suberina (Fig.4.10), lo que puede interpretarse como que en plantas de 21 días la endodermis no se encuentra aún desarrollada.

En estas mismas secciones transversales se observó tinción de los vasos xilemáticos. A pesar de que el Fluorol Yellow se considera como un colorante que tiñe la suberina (Lux *et al.*, 2005), también puede llegar a teñir los vasos del xilema cuando la tinción de contraste no se realiza correctamente (Geldner, comunicación personal). Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de mejorar el protocolo de tinción, ya sea utilizando otras tinciones de contraste, aumentando el tiempo de esta tinción de contraste o realizando los cortes transversales a mano alzada una vez concluida la tinción de Fluorol Yellow.

En relación a la exodermis, generalmente se suele asociar su desarrollo a ciertas condiciones de estrés, como la salinidad (Reinhardt y Rost, 1995). Sin embargo, también se ha descrito que en condiciones de cultivo hidropónico no salino, plantas de arroz desarrollan una exodermis diferenciada (Krishnamurthy *et al.*, 2009) mientras que otras especies como maíz o cebada carecen de ella (Zimmermann *et al.*, 2000; Knipfer, 2010). Estos resultados confirman que no todas las especies son capaces de desarrollar exodermis (Perumalla *et al.*, 1990). Con respecto al tomate existen datos contradictorios, ya que algunos autores han descrito la no formación de exodermis (Peyrano *et al.*, 1997) mientras que otros sí han observado dicha capa celular (Lucena *et al.*, 2003). El estudio histológico desarrollado en el presente trabajo avala los resultados obtenidos por Lucena *et al.* (2003), al revelar la presencia de una exodermis en los cuatro genotipos analizados (MM, TO-937, RIL 65 y RIL 121) en plantas cultivadas bajo condiciones de crecimiento similares a las utilizadas por ellos.

Como se ha comentado anteriormente, el desarrollo de la exodermis supone una barrera significativa en el flujo radial de agua hacia el interior del córtex (Freundl *et al.*, 2000; Steudle, 2000), de manera que raíces con una exodermis suberificada presentan valores de Lpr más bajos que aquellas que carecen de dicha capa celular (Rieger y Litvin, 1999; Zimmermann *et al.*, 2000). Asimismo, la mayor presencia de las células de paso, que carecen de depósitos de suberina y

por tanto ejercen una menor resistencia al movimiento del agua (Peterson y Enstone, 1996), se ha asociado con mayores valores de Lpr (Huang y Eissenstat, 2000). La Lpr registrada en el genotipo parental doméstico MM y en la RIL 65 fue significativamente mayor que la observada en el genotipo parental silvestre TO-937 y en la RIL 121 (Fig.4.3, Lpr control). Esta diferencia en Lpr puede ser debida a la diferencia observada en el número de células de paso, ya que a pesar de que todas presentaron una exodermis suberificada, tanto TO-937 como RIL 121 registraron un menor número de ellas con respecto a MM y a RIL 65 (Fig.4.11). A su vez, las diferencias registradas en los valores de Lpr entre el parental doméstico MM y la RIL 65 (un 40% mayor en MM) podrían estar relacionadas también con la mayor presencia de células de paso en MM. Sin embargo, para poder establecer esta relación de un modo más asertivo, sería necesario analizar la exodermis a lo largo de toda la longitud de la raíz, debido a que se observó que secciones transversales de una misma planta, presentaban diferencias en el número de células de paso presentes (Fig.4.11).

El estudio histológico preliminar establece diferencias en la deposición de suberina en los 2 genotipos parentales y en las líneas RILs 65 y 121. Sin embargo, además de la localización de la suberina se ha determinado que diferencias en la composición química de la suberina también podrían estar condicionando la absorción de agua (Schreiber, 2010; Ranathunge y Schreiber, 2011). Tal es así que en plantas de *Arabidopsis* se ha descrito que alteraciones en genes específicos involucrados en la síntesis de la suberina como *GPAT5* (At3g11430), *DSO/ABCG11/COF1* (At1g17840) o *KCS2/DAISY* (At1g04220) provocan alteraciones en la composición y/o cantidad de la suberina presente en la endodermis (Beisson *et al.*, 2007; Franke *et al.*, 2009; Panikashvili *et al.*, 2010). En la familia *Solanaceae*, se ha descrito que el gen *CYP86A33* es crítico para la biosíntesis del dominio alifático de la suberina en la peridermis de patata (Serra *et al.*, 2009). El silenciamiento de dicho gen conlleva alteraciones en la estructura de la epidermis, disminuyendo su funcionalidad como barrera frente al

agua. La obtención en un futuro de plantas de tomate con sobreexpresión y/o silenciamiento de genes esenciales para la síntesis de suberina será clave para obtener evidencias directas del papel de este biopolímero en la captación de agua en tomate.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DISCUSIÓN GENERAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En el sudeste español, la escasez de lluvias, el uso abusivo de las reservas de agua dulce y la contaminación y/o salinización de las mismas (Laraus, 2004; Morison *et al.*, 2008) están poniendo en peligro la sostenibilidad de la producción agrícola. Esta situación es especialmente crítica en el litoral mediterráneo, donde se concentra la producción hortícola de tomate bajo invernadero (MAGRAMA, 2012), planta que requiere de elevadas cantidades de agua para su cultivo (Reina-Sanchez *et al.*, 2005).

En las últimas décadas se ha avanzado mucho en el conocimiento de la ecofisiología de dicho cultivo en relación a las condiciones ambientales dentro de los invernaderos, la demanda transpiratoria que ello conlleva y el impacto que la radiación, la temperatura y/o la humedad ambiental tienen sobre la cantidad y calidad de la cosecha (Romero-Aranda *et al.*, 2002; Chaves y Oliveira, 2004; Guichard *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2009). Pero dado que el gasto que supone el agua de riego es mínimo respecto a otros inputs como fertilizantes o plaguicidas, hasta ahora el riego se viene aplicando en exceso, de manera que más de un 30% del agua aportada se pierde en forma de lixiviados.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral parte del planteamiento de que el consumo de agua es un parámetro clave en la productividad del cultivo de tomate, ya que está directamente relacionado con el peso fresco de los frutos, cuyo contenido de agua es más del 90% (Davies *et al.*, 1981). Desde esta perspectiva, una planta con una gran capacidad para absorber agua por las raíces estará en un estado más ventajoso para abastecer la demanda originada por transpiración foliar, permitiendo que a los frutos también les pueda llegar más agua. Por tanto, para mejorar el uso eficiente del agua de riego en este cultivo, sería conveniente incrementar la capacidad de las raíces para absorber el agua de riego, lo que contribuiría a reducir la pérdida de agua por lixiviados.

En este sentido, los estudios llevados a cabo en esta tesis han permitido generar información sobre algunos parámetros clave implicados en la

conductividad hidráulica de las raíces de tomate. Partiendo del supuesto de que la conductividad hidráulica debería ser el resultado de varios caracteres que, en su conjunto, favorecen una mayor superficie de absorción y menor resistencia a los flujos radial y axial dentro de la raíz, la información generada ha permitido identificar algunos parámetros que presentan una mayor repercusión sobre la Lpr registrada en el órgano completo. Entre estos parámetros destacan la expresión y/o actividad de acuaporinas, claves en el proceso de absorción de agua (Tyerman *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 2008) y que requerirán estudios más profundos, y el número de células de paso en la exodermis. No obstante, dada la segregación de caracteres que existe en la población RIL utilizada para este estudio, es posible que en una misma línea el efecto de unos parámetros sobre el flujo de agua haya podido quedar enmascarado por el efecto inhibitor de otros.

La alta variabilidad encontrada en la mayoría de los caracteres estudiados permite seleccionar genotipos contrastantes que serán muy útiles en futuras investigaciones. En este sentido, cabe destacar la variabilidad encontrada en la tasas de elongación y de ramificación que merece seguir investigándose por sus implicaciones en la ocupación y explotación de un determinado volumen de sustrato y por tanto en la eficiencia de uso del agua de riego. Por otra parte, también presenta interés estudiar la capacidad de estos genotipos para generar nuevas raíces en relación a la resiliencia de la planta frente a situaciones de estrés ambiental (déficit hídrico) y/o en el sustrato (salinidad).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una alta variabilidad en la conductividad hidráulica de las raíces, que además permanece estable con el desarrollo vegetativo de la planta, al menos en los genotipos parentales. Por tanto la variabilidad encontrada en la Lpr en plantas jóvenes podría determinar la productividad en plantas adultas. En este sentido, un ensayo preliminar en condiciones de cultivo comercial en invernadero, en el que las 13 RILs evaluadas se utilizaron como portainjertos del parental doméstico MM, mostró diferencias significativas en la superficie foliar y en el contenido de agua de la

parte aérea. Aunque hubo diferencias en la producción de frutos, estas no fueron significativas, probablemente porque la competencia por el agua entre hojas y frutos durante el periodo de primavera-verano en que se llevó a cabo el ensayo, pudo enmascarar el efecto de la Lpr.

Un ideotipo de raíz en cualquier escenario de cultivo debería ser aquel que presente la mayor superficie de contacto con el medio y con poca inversión en términos de carbono y gasto metabólico de mantenimiento. Por ello son necesarios más estudios sobre el impacto en el estado hídrico de la planta de parámetros como los pelos radicales, que a priori podrían tener un menor coste metabólico y cuya inducción parece variar según el estado fenológico de la planta y las condiciones de cultivo (Bates y Lynch, 2000). Generar información sobre la componente genética de la variabilidad en la densidad y longitud de los pelos radicales, su contribución en la superficie de la raíz en distintos estadios de desarrollo de las plantas, el impacto de situaciones de altas tasas de transpiración y la salinidad en el sustrato permitiría conocer la capacidad de un determinado genotipo para capturar el agua de riego. Este conocimiento permitiría ajustar el volumen de riego a las capacidades del genotipo, reduciendo las pérdidas de agua por lixiviados.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CONCLUSIONES GENERALES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- 1- La población RIL estudiada presenta una gran variabilidad en el consumo de agua, que está correlacionado tanto con el desarrollo de la raíz como con el desarrollo de la parte aérea.
- 2- La población RIL estudiada presenta una gran variabilidad en la WP que no está correlacionada con el consumo de agua.
- 3- Los análisis estadísticos señalan al diámetro del tallo como el parámetro más estrechamente relacionado con la WP_{PF} . Se sugiere que los tallos podrían actuar como órganos de reserva de agua que por su proximidad a hojas y frutos facilitaría una rápida respuesta a la demanda hídrica que presenten estos órganos. Además, este parámetro presenta un alto índice de heredabilidad por lo que sería apropiado para ser considerado en programas de mejora de la WP.
- 4- La Lpr de raíces de plantas de 21 DDG muestra una alta variabilidad entre los genotipos parentales y las distintas líneas RILs, registrándose diferencias de más del 80% entre algunas de ellas.
- 5- De forma general, las diferencias de la Lpr entre los genotipos parentales y entre éstos y las líneas RILs se mantuvieron estables independientemente de que en su cálculo se usara la longitud, la superficie o el peso seco de la raíz.
- 6- La variabilidad presente en los parámetros de longitud y superficie de la raíz, así como la proporción de raíces finas, medias y gruesas son insuficientes para explicar las diferencias encontradas en los dos genotipos parentales y en las distintas líneas RILs.
- 7- Los valores de Lpr de los genotipos parentales presentan valores similares en los dos estadios analizados (21 y 40 DDG), posiblemente como consecuencia de la proporcionalidad en el incremento a lo largo del tiempo de la superficie de absorción y de la capacidad de transporte radial y axial.

- 8- Existe una alta variabilidad en la tasa de elongación, número de raíces laterales y densidad de ramificación, que determinan diferencias significativas en la arquitectura del sistema radicular. Esta variabilidad permite seleccionar genotipos contrastantes que podrán ser evaluados en relación a la eficiencia de uso del agua de riego y la productividad en situaciones de cultivo real bajo invernadero.
- 9- El diámetro de la raíz, la anchura del córtex, y el número de capas celulares que conforman el córtex, medidos a 15 mm del ápice, es similar en los dos genotipos parentales y en las 13 líneas RILs evaluadas. Puesto que estos parámetros varían a lo largo de la longitud de la raíz, sería conveniente estudiar su variabilidad en zonas de la raíz con crecimiento secundario, donde el metaxilema presenta su máximo desarrollo y en cuya superficie, en contra de lo generalmente aceptado, también hemos podido observar una alta densidad de pelos radicales.
- 10- El número de vasos xilemáticos y su diámetro medidos a 15 mm del ápice presentan diferencias significativas entre las distintas líneas. Sin embargo, estas diferencias son insuficientes para explicar la variabilidad registrada en la Lpr.
- 11- El tratamiento de raíces de tomate con HgCl_2 , inhibidor reversible de acuaporinas, reduce la conductividad hidráulica (Lpr) medida bajo gradientes de presión osmótica, entre un 42 y un 80%. Este hecho parece indicar que, en algunas de las líneas estudiadas, el transporte de agua se da mayoritariamente a través de la vía transcelular.
- 12- El tratamiento con mercurio causa un efecto tóxico en algunos de los genotipos de tomate analizados puesto que en alguno de ellos la inhibición de las AQP's no fue totalmente reversible.
- 13- La diferencia encontrada en la expresión relativa de cuatro genes que codifican para PIPs cuya expresión es mayoritaria en raíz de tomate no explica la variabilidad registrada en la Lpr entre las distintas líneas. Se

hace necesario extender el estudio de expresión génica a otros genes PIPs.

- 14- La caracterización preliminar de la deposición de biopolímeros de barrera en los genotipos parentales y en las líneas RILs 65 y 121 parece indicar la ausencia de una endodermis suberificada y la presencia de suberina en la exodermis a 21 DDG y en los primeros 20 mm de la zona basal de la raíz principal. Los valores de Lpr medidos en este estadio parecen correlacionarse con la existencia de células de paso en la exodermis.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ (1998) The Aquaporins, Blueprints for Cellular Plumbing Systems. *Journal of Biological Chemistry* 273: 14659-14662.
- Aguilera F (2006) Hacia una nueva economía del agua: cuestiones fundamentales. *Polis Revista Latinoamericana* 14: 1-14.
- Ahkami AH, Lischewski S, Haensch K-T, Porfirova S, Hofmann J, Rolletschek H, Melzer M, Franken P, Hause B, Druege U, Hajirezaei MR (2009) Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist* 181: 613-625.
- Alba J (2006) Herencia de los mecanismos de resistencia a araña roja en tomate. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. España.
- Alba J, Montserrat M, Fernández-Muñoz R (2009) Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Experimental and Applied Acarology* 47: 35-47.
- Alberto F, Machín J, Aragüés R (1983) Razones y distribución espacial de la salinidad de los suelos y aguas superficiales de la Cuenca del Ebro. Seminario "El sistema integrado del Ebro", Barcelona, 23-25 febrero.
- Alcamo J, Flörke M, Märker M (2007) Future long-term changes in global water resources driven by socio-economic and climatic changes. *Hydrological Sciences Journal* 52: 247-275.
- Aldanondo AM (1995) Cultivo y Producción de Tomate en la Unión Europea y en España. En: Nuez F (ed). *El cultivo de tomate*. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 696-740.
- Alexandersson E, Frayse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole Gene Family Expression and Drought Stress Regulation of Aquaporins. *Plant Molecular Biology* 59: 469-484.
- Almeida-Rodriguez AM, Hacke UG, Laur J (2011) Influence of evaporative demand on aquaporin expression and root hydraulics of hybrid poplar. *Plant, Cell & Environment* 34: 1318-1331.
- Amodeo G, Dorr R, Vallejo A, Sutka M, Parisi M (1999) Radial and axial water transport in the sugar beet storage root. *Journal of Experimental Botany* 50: 509-516.

- An P, Inanaga S, Li XJ, Eneji AE, Zhu NW (2005) Interactive Effects of Salinity and Air Humidity on Two Tomato Cultivars Differing in Salt Tolerance. *Journal of Plant Nutrition* 28: 459-473.
- Anyia AO, Herzog H (2004) Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy* 20: 327-339.
- Arano CR (2007) Hidroponía: algunas páginas de su historia. *Horticultura internacional*: 24-33.
- Arbel A, Yekutieli O, Barak M (1999) Performance of a fog system for cooling greenhouses. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72: 129-136.
- Armengaud P, Zambaux K, Hills A, Sulpice R, Pattison RJ, Blatt MR, Amtmann A (2009) EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *The Plant Journal* 57: 945-956.
- Aroca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, Chrispeels MJ (2005) The Role of Aquaporins and Membrane Damage in Chilling and Hydrogen Peroxide Induced Changes in the Hydraulic Conductance of Maize Roots. *Plant Physiology* 137: 341-353.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 63: 43-57.
- Aroca R, Vernieri P, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Tognoni F, Pardossi A (2003) Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science* 165: 671-679.
- Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany* 100: 1085-1094.
- Barrowclough DE, Peterson CA, Steudle E (2000) Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. *Journal of Experimental Botany* 51: 547-557.
- Barrs H, Weatherley P (1962) A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 413-428.
- Bates TR, Lynch JP (2000) Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany* 87: 958-963.
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE (2009) Root suberin forms

- an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. PLoS genetics 5: e1000492.
- Beebo A, Thomas D, Der C, Sanchez L, Leborgne-Castel N, Marty F, Schoefs B, Bouhidel K (2009) Life with and without AtTIP1;1, an Arabidopsis aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles. Plant Molecular Biology 70: 193-209.
- Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB (2007) The Acyltransferase GPAT5 Is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of Arabidopsis. The Plant Cell 19: 351-368.
- Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 269-274.
- Bergougnoux V (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32: 170-189.
- Bernards MA (2002) Demystifying suberin. Canadian Journal of Botany 80: 227-240.
- Besse M, Knipfer T, Miller AJ, Verdeil J-L, Jahn TP, Fricke W (2011) Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Journal of Experimental Botany 62:4127-4142.
- Bibikova T, Gilroy S (2002) Root hair development. Journal of Plant Growth Regulation 21: 383-415.
- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. The Plant Journal 18: 565-570.
- Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F (2011) *Solanaceae* XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. The Plant Journal 66: 306-317.
- Bienert GP, Cavez D, Besserer A, Berny MC, Gilis D, Rooman M, Chaumont F (2012) A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. Biochemical Journal 445: 101-111.
- Bienert GP, Heinen RB, Berny MC, Chaumont F (2014) Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta 1838: 216-222.

- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 994-1003.
- Bolh  r-Nordenkamp HR,   quist G (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall O, Scurlock JMO, Bolh  r-Nordenkamp HR, Leegood RC, Long SP (eds). *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman & Hill. London, United Kingdom. pp 193-206.
- Bouman BAM (2007) A conceptual framework for the improvement of crop water productivity at different spatial scales. *Agricultural Systems* 93: 43-60.
- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu D-T, Tournaire-Roux C, Maurel C (2008) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *The Plant Journal* 56: 207-218.
- Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiology* 139: 790-805.
- Boyer JS (1985) Water transport. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 473-516.
- Bramley H (2006) Water flow in the roots of three crop species: the influence of root structure, aquaporin activity and waterlogging. Tesis Doctoral. University of Western. Australia.
- Bramley H, Turner D, Tyerman S, Turner N (2007) Water flow in the roots of crop species: the influence of root structure, aquaporin activity, and waterlogging. *Advances in agronomy* 96: 133-196.
- Bramley H, Turner NC, Turner DW, Tyerman SD (2009) Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. *Plant Physiology* 150: 348-364.
- Brodersen CR, McElrone AJ (2013) Maintenance of xylem Network Transport Capacity: A Review of Embolism Repair in Vascular Plants. *Frontiers in Plant Science* 4: 108.
- Broman KW (2005) The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics* 169: 1133-1146.
- Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiology* 110: 3-13.

- Caro M, Cruz V, Cuartero J, Estan M, Bolarin M (1991) Salinity tolerance of normal-fruited and cherry tomato cultivars. *Plant and Soil* 136: 249-255.
- Carvajal M, Cerdá A, Martínez V (2000) Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *New Phytologist* 145: 439-447.
- Carvajal M, Cooke D, Clarkson D (1996) Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta* 199: 372-381.
- Carvajal M, Martínez V, Alcaraz CF (1999) Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum* 105: 95-101.
- Casero PJ, Casimiro I, Lloret PG (1995) Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant species: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma* 188: 49-58.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell Online* 13: 843-852.
- Coaker GL, Meulia T, Kabelka EA, Jones AK, Francis DM (2002) A QTL controlling stem morphology and vascular development in *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* (*Solanaceae*) crosses is located on chromosome 2. *American Journal of Botany* 89: 1859-1866.
- Coleman WK, Greyson RI (1976) The growth and development of the leaf in tomato (*Lycopersicon esculentum*). I. The plastochron index, a suitable basis for description. *Canadian Journal of Botany* 54: 2421-2428.
- Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science* 4: 442.
- Connor D, Legge N, Turner N (1977) Water Relations of Mountain Ash (*Eucalyptus regnans* F. Muell.) Forests. *Functional Plant Biology* 4: 753-762.
- Cooper DC (1927) Anatomy and development of tomato flower. *Botanical Gazette* 83: 399-411.
- Cruz V, Cuartero J, Bolarin M, Romero M (1990) Evaluation of characters for ascertaining salt stress responses in *Lycopersicon* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115: 1000-1003.

- Cuartero J, Bolarin M, Asins M, Moreno V (2006) Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of experimental botany* 57: 1045-1058.
- Cuartero J, Fernández-Muñoz R, González-Fernández J (1995) Estreses Abióticos. En: Nuez F (ed). *El cultivo de tomate*. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 352-383.
- Chamarro J (1995) Anatomía y Fisiología de la Planta. En: Nuez F (ed). *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 13-42.
- Chapagain AK, Hoekstra AY (2008) The global component of freshwater demand and supply: an assessment of virtual water flows between nations as a result of trade in agricultural and industrial products. *Water international* 33: 19-32.
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ (2000) Plasma Membrane Intrinsic Proteins from Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity. *Plant Physiology* 122: 1025-1034.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001) Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. *Plant Physiology* 125: 1206-1215.
- Chaumont F, Tyerman SD (2014) Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. *Plant Physiology*.
- Chaves M, Pereira J, Maroco J, Rodrigues M, Ricardo C, Osório M, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55: 2365-2384.
- Chen C-W, Yang Y-W, Lur H-S, Tsai Y-G, Chang M-C (2006) A Novel Function of Abscissic Acid in the Regulation of Rice (*Oryza sativa* L.) Root Growth and Development. *Plant and Cell Physiology* 47: 1-13.
- Chirino E, Bellot J, Sánchez J (2011) Daily sap flow rate as an indicator of drought avoidance mechanisms in five Mediterranean perennial species in semi-arid southeastern Spain. *Trees* 25: 593-606.
- Choat B, Ball M, Luyt J, Holtum J (2003) Pit Membrane Porosity and Water Stress-Induced Cavitation in Four Co-Existing Dry Rainforest Tree Species. *Plant Physiology* 131: 41-48.

- Cholewa EM (2000) Calcium transport and delivery to the xylem in onion (*Allium cepa* L.) roots.
- Chrispeels MJ, Maurel C (1994) Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiology* 105: 9-13.
- Dalla Vecchia F, Cuccato F, La Rocca N, Larcher W, Rascio N (1999) Endodermis-like Sheaths in the Submerged Freshwater Macrophyte *Ranunculus trichophyllus* Chaix. *Annals of Botany* 83: 93-97.
- Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE, Chrispeels MJ (1996) Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *The Plant Cell* 8: 587-599.
- Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ (1994) The Plasma Membrane of *Arabidopsis thaliana* Contains a Mercury-Insensitive Aquaporin That Is a Homolog of the Tonoplast Water Channel Protein TIP. *Plant Physiology* 106: 1325-1333.
- Danielson JÅ, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 8: 45.
- Darwin SC, Knapp S, Peralta IE (2003) Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (*Solanaceae*). *Systematics and Biodiversity* 1: 29-53.
- Davies JN, Hobson GE, McGlasson WB (1981) The constituents of tomato fruit — the influence of environment, nutrition, and genotype. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15: 205-280.
- Davies WJ, Bacon MA, Stuart Thompson D, Sobeih W, González Rodríguez L (2000) Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: exploitation of the plants' chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. *Journal of Experimental Botany* 51: 1617-1626.
- De Boer AH, Volkov V (2003) Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant, Cell & Environment* 26: 87-101.
- De Candolle A (1885) *Origin of cultivated plants*. New York. Hafner Publishing Company.
- de Dorlodot S, Forster B, Pagès L, Price A, Tuberosa R, Draye X (2007) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science* 12: 474-481.

- De Simone O, Haase K, Müller E, Junk WJ, Hartmann K, Schreiber L, Schmidt W (2003) Apoplastic Barriers and Oxygen Transport Properties of Hypodermal Cell Walls in Roots from Four Amazonian Tree Species. *Plant Physiology* 132: 206-217.
- De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inzé D, Foyer CH, Zhang H (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33: 543-555.
- Deak KI, Malamy J (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* 43: 17-28.
- Dubrovsky JG, Forde BG (2012) Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them. *The Plant Cell Online* 24: 4-14.
- Dubrovsky JG, Napsucialy-Mendivil S, Duclercq J, Cheng Y, Shishkova S, Ivanchenko MG, Friml J, Murphy AS, Benková E (2011) Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytologist* 191: 970-983.
- Eckert M, Biela A, Siefritz F, Kaldenhoff R (1999) New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany* 50: 1541-1545.
- Eissenstat DM (1992) Costs and benefits of constructing roots of small diameter. *Journal of Plant Nutrition* 15: 763-782.
- Enstone D, Peterson C, Ma F (2003) Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351.
- Esau K (1967) *Plant anatomy*. New York. Wiley and Sons, Inc.
- Escobar-Bravo R (2013) Genetics and control of the pest resistance found in the wild tomato species *Solanum pimpinellifolium* based on type IV glandular trichomes and their associated secretions. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. España.
- Escobar I, Berenguer JJ, Navarro M, Cuartero J (2012) La calidad gustativa y nutricional como atributos para liderar el mercado de tomate en fresco. Granada. Caja Rural de Granada, Gabinete Técnico.
- Espelie KE, Kolattukudy PE (1979) Composition of the Aliphatic Components of Suberin of the Endodermal Fraction from the First Internode of Etiolated *Sorghum* Seedlings. *Plant Physiology* 63: 433-435.

- Esquinas-Alcázar J, Nuez F (1995) Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate en el cultivo de tomate. En: Nuez F (ed). El cultivo del tomate. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 13-42.
- Esquinas-Alcázar JT (1981) Genetic resources of tomatoes and wild relatives: A global report. International Board for Plant Genetics resources, Rome.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. BMC Plant Biology 8: 131.
- Falah M, Wajima T, Yasutake D, Sago Y, Kitano M (2010) Responses of root uptake to high temperature of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in soil-less culture. Journal of Agricultural Technology 6: 543-558.
- FAOSTAT (2012) Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat3.fao.org>.
- FAOSTAT (2013) Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat3.fao.org>.
- Fernández-García N, Martínez V, Cerdá A, Carvajal M (2002) Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. Journal of Plant Physiology 159: 899-905.
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F (2004) Interactions between Plasma Membrane Aquaporins Modulate Their Water Channel Activity. The Plant Cell 16: 215-228.
- Fitter A (2002) Characteristics and functions of root systems. En: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds). Plant roots: the hidden half. Marcel Dekker Inc. Basel, Switzerland. pp 21-50.
- Flores-Díaz A, Gálvez-Valcárcel V, Hernández-Lara O (1996) Salinidad un nuevo concepto. Universidad de Colima. México.
- Flores FB, Sanchez-Bel P, Estañ MT, Martinez-Rodriguez MM, Moyano E, Morales B, Campos JF, Garcia-Abellán JO, Egea MI, Fernández-García N, Romojaro F, Bolarín MC (2010) The effectiveness of grafting to improve tomato fruit quality. Scientia Horticulturae 125: 211-217.
- Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. International Journal of Plant Genomics 2007: 64358
- Fortin MG, Morrison NA, Verma DPS (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. Nucleic Acids Research 15: 813-824.

- Franke R, Höfer R, Briesen I, Emsermann M, Efremova N, Yephremov A, Schreiber L (2009) The DAISY gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *The Plant Journal* 57: 80-95.
- Freundl E, Steudle E, Hartung W (2000) Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* 210: 222-231.
- Frick A, Jarva M, Ekvall M, Uzdavinyas P, M N, Tornroth-Horsefield S (2013) Mercury increases water permeability of a plant aquaporin through a non-cysteine-related mechanism. *Biochemical Journal* 454: 491-499.
- Fritz M, Ehwald R (2011) Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots. *New Phytologist* 189: 210-217.
- Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A (2002) Structure and Function of Water Channels. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 509-515.
- Gambetta GA, Fei J, Rost TL, Knipfer T, Matthews MA, Shackel KA, Walker MA, McElrone AJ (2013) Water Uptake along the Length of Grapevine Fine Roots: Developmental Anatomy, Tissue-Specific Aquaporin Expression, and Pathways of Water Transport. *Plant Physiology* 163: 1254-1265.
- Geldner N (2013a) Casparian strips. *Current Biology* 23: R1025-R1026.
- Geldner N (2013b) The Endodermis. *Annual Review of Plant Biology* 64: 531-558.
- Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C (2002) The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *The Plant Journal* 30: 71-81.
- Gilroy S, Jones DL (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in plant science* 5: 56-60.
- Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel J-P, Horwitz J (1984) The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: Characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* 39: 49-59.
- Grindlay AL, Zamorano M, Rodríguez MI, Molero E, Urrea MA (2011) Implementation of the European Water Framework Directive: Integration of hydrological and regional planning at the Segura River Basin, southeast Spain. *Land Use Policy* 28: 242-256.

- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N (2013) Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiology* 163: 161-179.
- Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace IS, Cobb JA, Roberts DM (2003) Phosphorylation of Soybean Nodulin 26 on Serine 262 Enhances Water Permeability and Is Regulated Developmentally and by Osmotic Signals. *The Plant Cell* 15: 981-991.
- Guichard S, Gary C, Leonardi C, Bertin N (2005) Analysis of Growth and Water Relations of Tomato Fruits in Relation to Air Vapor Pressure Deficit and Plant Fruit Load. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 201-213.
- Gustavsson S, Lebrun A-S, Nordén K, Chaumont F, Johanson U (2005) A Novel Plant Major Intrinsic Protein in *Physcomitrella patens* Most Similar to Bacterial Glycerol Channels. *Plant Physiology* 139: 287-295.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126: 457-461.
- Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F (2006) Localization and Quantification of Plasma Membrane Aquaporin Expression in Maize Primary Root: A Clue to Understanding their Role as Cellular Plumbers. *Plant Molecular Biology* 62: 305-323.
- Hachez C, Veselov D, Ye Q, Reinhardt H, Knipfer T, Fricke W, Chaumont F (2012) Short-term control of maize cell and root water permeability through plasma membrane aquaporin isoforms. *Plant, Cell & Environment* 35: 185-198.
- Henry A, Gowda VRP, Torres RO, McNally KL, Serraj R (2011) Variation in root system architecture and drought response in rice (*Oryza sativa*): Phenotyping of the OryzaSNP panel in rainfed lowland fields. *Field Crops Research* 120: 205-214.
- Henzler T, Steudle E (1995) Reversible closing of water channels in *Chara* internodes provides evidence for a composite transport model of the plasma membrane. *Journal of Experimental Botany* 46: 199-209.
- Heydari N (2014) Water productivity in agriculture: challenges in concepts, terms and values. *Irrigation and Drainage* 63: 22-28.

- Hirano Y, Okimoto N, Kadohira I, Suematsu M, Yasuoka K, Yasui M (2010) Molecular Mechanisms of How Mercury Inhibits Water Permeation through Aquaporin-1: Understanding by Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal* 98: 1512-1519.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular California Agricultural Experiment Station 347.
- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M, Woll K (2004) From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends in Plant Science* 9: 42-48.
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M (2009) Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil* 321: 153-187.
- Holm L, Jahn T, Møller AB, Schjoerring J, Ferri D, Klaerke D, Zeuthen T (2005) NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 450: 415-428.
- Hölttä T, Cochard H, Nikinmaa E, Mencuccini M (2009) Capacitive effect of cavitation in xylem conduits: results from a dynamic model. *Plant, Cell & Environment* 32: 10-21.
- Hortoinfo (2013) Diario digital de la Actualidad Hortofrutícola. <http://www.hortoinfo.es/>.
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* 52: 2245-2264.
- Huang B, Eissenstat DM (2000) Linking hydraulic conductivity to anatomy in plants that vary in specific root length. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 260-264.
- Huang B, Nobel PS (1993) Hydraulic conductivity and anatomy along lateral roots of cacti: changes with soil water status. *New phytologist*: 499-507.
- Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier É, Roumet C (2007) Relating root structure and anatomy to whole-plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean species. *New Phytologist* 173: 313-321.
- Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 579: 5814-5820.

- Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Güçlü J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schäffner AR, Bouchez D, Maurel C (2003) Role of a Single Aquaporin Isoform in Root Water Uptake. *The Plant Cell* 15: 509-522.
- Javot H, Maurel C (2002) The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Annals of Botany* 90: 301-313.
- Jeje AYA, Zimmermann MH (1979) Resistance to Water Flow in Xylem Vessels. *Journal of Experimental Botany* 30: 817-827.
- Jenkins J (1948) The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* 2: 379-392.
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001) The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in Arabidopsis Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants. *Plant Physiology* 126: 1358-1369.
- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998) Water Transport Activity of the Plasma Membrane Aquaporin PM28A Is Regulated by Phosphorylation. *The Plant Cell* 10: 451-459.
- Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *The Plant Cell* 8: 1181-1191.
- Jonston JS, Pepper AE, Hall AE, Chen ZJ, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price HJ (2005) Evolution of Genome Size in *Brassicaceae*. *Annals of Botany* 95: 229-235.
- Jung JKH, McCouch S (2013) Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science* 4: 186.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 14648-14654.
- Jurado O, Albacete A, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, Pérez-Alfocea F, Dodd IC, Romero-Aranda MR (2009) Water relations of the *tos1* tomato mutant at contrasting evaporative demand. *Physiologia Plantarum* 137: 36-43.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu J-J, Zimmermann U (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 14: 121-128.

- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR (1994) Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *The Plant Journal* 6: 187-199.
- Katerji N, Mastrorilli M, Rana G (2008) Water use efficiency of crops cultivated in the Mediterranean region: Review and analysis. *European Journal of Agronomy* 28: 493-507.
- Kim HK, Park J, Hwang I (2014) Investigating water transport through the xylem network in vascular plants. *Journal of Experimental Botany* 65: 1895-1904.
- Knipfer T (2010) Involvement of aquaporins in water uptake of seminal and adventitious roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) and their role in whole-plant water flow. Thesis. School of Biology and Environmental Science, University College Dublin, Ireland.
- Knipfer T, Das D, Steudle E (2007) During measurements of root hydraulics with pressure probes, the contribution of unstirred layers is minimized in the pressure relaxation mode: comparison with pressure clamp and high-pressure flowmeter. *Plant, cell & environment* 30: 845-860.
- Knipfer T, Fricke W (2010) Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 187: 159-170.
- Knipfer T, Fricke W (2011) Water uptake by seminal and adventitious roots in relation to whole-plant water flow in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 62: 717-733.
- Knipfer T, Fricke W (2014) Root Aquaporins. En: Morte A, Varma A (eds). *Root Engineering*. Springer. Berlin, Heidelberg. Germany. pp 269-296.
- Kolb KJ, Sperry JS, Lamont BB (1996) A method for measuring xylem hydraulic conductance and embolism in entire root and shoot systems. *Journal of Experimental Botany* 47: 1805-1810.
- Kong X-Q, Gao X-H, Sun W, An J, Zhao Y-X, Zhang H (2011) Cloning and functional characterization of a cation-chloride cotransporter gene OsCCC1. *Plant Molecular Biology* 75: 567-578.
- Kramer P (1983) *Water relations of plants*. Academic Press. London, United Kingdom.
- Kramer PJ, Tejada L (1974) *Relaciones hídricas de suelo y plantas: una síntesis moderna*. Edutex. Mexico

- Krishnamurthy P, Ranathunge K, Franke R, Prakash HS, Schreiber L, Mathew MK (2009) The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 230: 119-134.
- Lambers H, Atkin OK, Millenaar FF (2002) Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. En: Waisel Y, Eshel A, Kafafi U (eds). *Plant Roots The Hidden Half* (Third Edition). Marcel Dekker, INC. Basel, Switzerland. pp 521-552.
- Landi P, Giuliani M, Darrah L, Tuberosa R, Conti S, Sanguineti M (2001) Variability for root and shoot traits in a maize population grown in hydroponics and in the field and their relationships with vertical root pulling resistance. *Maydica* 46: 177-182.
- Landi P, Giuliani S, Salvi S, Ferri M, Tuberosa R, Sanguineti MC (2010) Characterization of *root-yield-1.06*, a major constitutive QTL for root and agronomic traits in maize across water regimes. *Journal of Experimental Botany* 61: 3553-3562.
- Laraus J (2004) The problems of sustainable water use in the Mediterranean and research requirements for agriculture. *Annals of Applied Biology* 144: 259-272.
- Lee J-M (1994) Cultivation of grafted vegetables I. Current status, grafting methods, and benefits. *HortScience* 29: 235-239.
- Lee SH, Singh AP, Chung GC (2004) Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport. *Journal of Experimental Botany* 55: 1733-1741.
- Leonardi C, Giuffrida F (2006) Variation of Plant Growth and Macronutrient Uptake in Grafted Tomatoes and Eggplants on Three Different Rootstocks. *European Journal of Horticultural Science* 71: 97-101.
- Lilley JM, Kirkegaard JA (2011) Benefits of increased soil exploration by wheat roots. *Field Crops Research* 122: 118-130.
- Liu F, VanToai T, Moy LP, Bock G, Linford LD, Quackenbush J (2005) Global Transcription Profiling Reveals Comprehensive Insights into Hypoxic Response in Arabidopsis. *Plant Physiology* 137: 1115-1129.
- Liu L-H, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, von Wirén N (2003) Urea Transport by Nitrogen-Regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 133: 1220-1228.
- Lobet G, Couvreur V, Meunier F, Javaux M, Draye X (2014) Plant Water Uptake in Drying Soils. *Plant Physiology* 164: 1619-1627.

- López-Pérez L, Fernández-García N, Olmos E, Carvajal M (2007) The Phi Thickening in Roots of Broccoli Plants: An Acclimation Mechanism to Salinity? *International Journal of Plant Sciences* 168: 1141-1149.
- Lopez D, Bronner G, Brunel N, Auguin D, Bourgerie S, Brignolas F, Carpin S, Tournaire-Roux C, Maurel C, Fumanal B, Martin F, Sakr S, Label P, Julien JL, Gousset-Dupont A, Venisse JS (2012) Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of Experimental Botany* 63: 2217-2230.
- Lopez F, Bousser A, Sissoëff I, Gaspar M, Lachaise B, Hoarau J, Mahé A (2003) Diurnal Regulation of Water Transport and Aquaporin Gene Expression in Maize Roots: Contribution of PIP2 Proteins. *Plant and Cell Physiology* 44: 1384-1395.
- Lorenzo P, Sánchez-Guerrero M, Medrano E, García M, Caparrós I, Giménez M (2003) El sombreado móvil exterior: efecto sobre el clima del invernadero, la producción y la eficiencia en el uso del agua y la radiación. En: Fernández M, Lorenzo P, Cuadrado I (eds). *Mejora de la eficiencia en el uso de agua en cultivos protegidos*. Dirección General de Investigación y Formación Agraria de la Junta de Andalucía, Cajamar. Almería. pp 207-229.
- Lovelli S, Perniola M, Ferrara A, Di Tommaso T (2007) Yield response factor to water (Ky) and water use efficiency of *Carthamus tinctorius* L. and *Solanum melongena* L. *Agricultural Water Management* 92: 73-80.
- Lucena MA, Romero-Aranda R, Mercado JA, Cuartero J, Valpuesta V, Quesada MA (2003) Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum* 118: 422-429.
- Luu D-T, Maurel C (2013) Aquaporin Trafficking in Plant Cells: An Emerging Membrane-Protein Model. *Traffic* 14: 629-635.
- Lux A, Luxov, aacute, Miroslava, Abe J, Morita S (2004) Root cortex: structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Research* 13: 117-131.
- Lux A, Morita S, Abe J, Ito K (2005) An Improved Method for Clearing and Staining Free-hand Sections and Whole-mount Samples. *Annals of Botany* 96: 989-996.
- Lynch J (1995) Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* 109: 7-13.
- Lynch JP (2013) Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Annals of Botany* 112: 347-357.

- Ma F, Peterson CA (2001) Development of cell wall modifications in the endodermis and exodermis of *Allium cepa* roots. *Canadian Journal of Botany* 79: 621-634.
- Ma F, Peterson CA (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* 81: 405-421.
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.
- Macey R (1984) Transport of water and urea in red blood cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 246: C195-C203.
- MacGregor DR, Deak KI, Ingram PA, Malamy JE (2008) Root System Architecture in Arabidopsis Grown in Culture Is Regulated by Sucrose Uptake in the Aerial Tissues. *The Plant Cell* 20: 2643-2660.
- Maggio A, Joly RJ (1995) Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems (evidence for a channel-mediated water pathway). *Plant Physiology* 109: 331-335.
- MAGRAMA (2012) Anuario de estadística del MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/default.aspx>.
- Manschadi AM, Christopher J, deVoil P, Hammer GL (2006) The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Functional Plant Biology* 33: 823-837.
- Martínez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallás V, Martínez V, Carvajal M (2003) Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology* 160: 689-697.
- Martre P, North GB, Nobel PS (2001) Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. *Plant Physiology* 126: 352-362.
- Maurel C (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Biology* 48: 399-429.
- Maurel C (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581: 2227-2236.
- Maurel C, Javot H, Lauvergeat V, Gerbeau P, Tournaire C, Santoni V, Heyes J (2002) Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology* 215: 105-148.

- Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. The EMBO Journal 14: 3028-3035.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. The EMBO Journal 12: 2241.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V (2008) Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. Annual Review of Plant Biology 59: 595-624.
- McCully M (1995) How Do Real Roots Work? (Some New Views of Root Structure). Plant Physiology 109: 1-6.
- McFarlane DJ, Williamson DR (2002) An overview of water logging and salinity in southwestern Australia as related to the 'Ucarro' experimental catchment. Agricultural Water Management 53: 5-29.
- Medici LO, Reinert F, Carvalho DF, Kozak M, Azevedo RA (2014) What about keeping plants well watered? Environmental and Experimental Botany 99: 38-42.
- Meharg AA, Jardine L (2003) Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. New Phytologist 157: 39-44.
- Miller DM (1985) Studies of Root Function in Zea mays: III. Xylem Sap Composition at Maximum Root Pressure Provides Evidence of Active Transport into the Xylem and a Measurement of the Reflection Coefficient of the Root. Plant Physiology 77: 162-167.
- Mittler R, Blumwald E (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. Annual Review of Plant Biology 61: 443-462.
- Miyamoto N, Steudle E, Hirasawa T, Lafitte R (2001) Hydraulic conductivity of rice roots. Journal of Experimental Botany 52: 1835-1846.
- Molden D, Oweis T, Steduto P, Bindraban P, Hanjra MA, Kijne J (2010) Improving agricultural water productivity: Between optimism and caution. Agricultural Water Management 97: 528-535.
- Molina-Montenegro MA, Zurita-Silva A, Oses R (2011) Effect of water availability on physiological performance and lettuce crop yield (*Lactuca sativa*). Ciencia e Investigación Agraria 38: 65-74.

- Monzón GC, Pinedo M, Lamattina L, de la Canal L (2012) Sunflower root growth regulation: the role of jasmonic acid and its relation with auxins. *Plant Growth Regulation* 66: 129-136.
- Morales D, Rodríguez P, Dell'Amico J, Nicolás E, Torrecillas A, Sánchez-Blanco MJ (2003) High-Temperature Preconditioning and Thermal Shock Imposition Affects Water Relations, Gas Exchange and Root Hydraulic Conductivity in Tomato. *Biologia Plantarum* 47: 203-208.
- Morison JIL, Baker NR, Mullineaux PM, Davies WJ (2008) Improving water use in crop production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 639-658.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599-605.
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64: 3983-3998.
- Muries B, Carvajal M, Martínez-Ballesta M (2013) Response of three broccoli cultivars to salt stress, in relation to water status and expression of two leaf aquaporins. *Planta* 237: 1297-1310.
- Nardini A, Salleo S, Jansen S (2011) More than just a vulnerable pipeline: xylem physiology in the light of ion-mediated regulation of plant water transport. *Journal of Experimental Botany* 62: 4701-4718.
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N (2012) Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 10101-10106.
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L (2013) Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 11: e0167.
- Nelissen H, Moloney M, Inzé D (2014) Translational research: from pot to plot. *Plant Biotechnology Journal* 12: 277-285.
- Nicotra A, Babicka N, Westoby M (2002) Seedling root anatomy and morphology: an examination of ecological differentiation with rainfall using phylogenetically independent contrasts. *Oecologia* 130: 136-145.

- Nielsen KL, Eshel A, Lynch JP (2001) The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Journal of Experimental Botany* 52: 329-339.
- Niemietz CM, Tyerman SD (1997) Characterization of Water Channels in Wheat Root Membrane Vesicles. *Plant Physiology* 115: 561-567.
- Niemietz CM, Tyerman SD (2002) New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Letters* 531: 443-447.
- Nobel PS (1999) *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic press. San Diego, CA, USA.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Orians GH, Solbrig OT (1977) A cost-income model of leaves and roots with special reference to arid and semiarid areas. *American Naturalist*: 677-690.
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science* 5: 1-8.
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* 58: 93-113.
- Otto B, Kaldenhoff R (2000) Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211: 167-172.
- Palta JA, Chen X, Milroy SP, Rebetzke GJ, Dreccer MF, Watt M (2011) Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments? *Functional Plant Biology* 38: 347-354.
- Panikashvili D, Shi JX, Bocobza S, Franke RB, Schreiber L, Aharoni A (2010) The Arabidopsis DSO/ABCG11 Transporter Affects Cutin Metabolism in Reproductive Organs and Suberin in Roots. *Molecular Plant* 3: 563-575.
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, Campbell BT (2010) Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology* 10: 142.
- Passioura J (1988) Water transport in and to roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 245-265.

- Passioura JB (1982) Water in the Soil-Plant-Atmosphere Continuum. En: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Physiological Plant Ecology II*. Springer. Berlin, Heidelberg, Germany. pp 5-33.
- Patanè C, Tringali S, Sortino O (2011) Effects of deficit irrigation on biomass, yield, water productivity and fruit quality of processing tomato under semi-arid Mediterranean climate conditions. *Scientia Horticulturae* 129: 590-596.
- Peralta I, Spooner DM (2006) History, Origin and Early Cultivation of Tomato (*Solanaceae*). En: Razdan M, Mattoo AK (eds) *Genetic improvement of solanaceous crops: Tomato*. CRC Press. Enfield, NH, USA. 1-24.
- Perdih F, Perdih A (2011) Lignin selective dyes: quantum-mechanical study of their characteristics. *Cellulose* 18: 1139-1150.
- Perry C, Steduto P, Allen RG, Burt CM (2009) Increasing productivity in irrigated agriculture: Agronomic constraints and hydrological realities. *Agricultural Water Management* 96: 1517-1524.
- Perumalla C, Peterson CA (1986) Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany* 64: 1873-1878.
- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 93-112.
- Peterson C, Murrmann M, Steudle E (1993) Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190: 127-136.
- Peterson C, Peterson RL, Robards AW (1978) A correlated histochemical and ultrastructural study of the epidermis and hypodermis of onion roots. *Protoplasma* 96: 1-21.
- Peterson C, Steudle E (1993) Lateral hydraulic conductivity of early metaxylem vessels in *Zea mays* L. roots. *Planta* 189: 288-297.
- Peterson CA (1988) Exodermal Casparian bands: their significance for ion uptake by roots. *Physiologia Plantarum* 72: 204-208.
- Peterson CA, Enstone DE (1996) Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum* 97: 592-598.
- Peterson RL (1992) Adaptations of root structure in relation to biotic and abiotic factors. *Canadian Journal of Botany* 70: 661-675.

- Peyrano G, Taleisnik E, Quiroga M, de Forchetti SM, Tigier H (1997) Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 387-393.
- Pfister A, Barberon M, Alassimone J, Kalmbach L, Lee Y, Vermeer JE, Yamazaki M, Li G, Maurel C, Takano J (2014) A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *Elife* 3: e03115.
- Picken A, Stewart K, Klapwijk D (1986) Germination and vegetative development. En: Atherton JG, Rudich J (eds). *The tomato crop*. Chapman and Hall. London, England. pp 111-166.
- Poorter L, McDonald I, Alarcón A, Fichtler E, Licona J-C, Peña-Claros M, Sterck F, Villegas Z, Sass-Klaassen U (2010) The importance of wood traits and hydraulic conductance for the performance and life history strategies of 42 rainforest tree species. *New Phytologist* 185: 481-492.
- Pozuelo JM, Espelie KE, Kolattukudy PE (1984) Magnesium Deficiency Results in Increased Suberization in Endodermis and Hypodermis of Corn Roots. *Plant Physiology* 74: 256-260.
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V (2008) Multiple Phosphorylations in the C-terminal Tail of Plant Plasma Membrane Aquaporins: Role in Subcellular Trafficking of AtPIP2;1 in Response to Salt Stress. *Molecular & Cellular Proteomics* 7: 1019-1030.
- Preston GM, Agre P (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 11110-11114.
- Preston GM, Agre P, et al. (1992) Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science* 256: 385.
- Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *Journal of Biological Chemistry* 268: 17-20.
- Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2001) From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome Biology* 3: 0001.1-0001.17.
- Ragab R (2014) Water use efficiency and water productivity. Comunicación Oral en el Workshop Water4Crops, Bengaluru, India.
- Ranathunge K, Schreiber L (2011) Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany* 62: 1961-1974.

- Rančić D, Quarrie SP, Pećinar I (2010) Anatomy of tomato fruit and fruit pedicel during fruit development. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* 2: 851-861.
- Reina-Sanchez A, Romero-Aranda R, Cuartero J (2005) Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agricultural water management* 78: 54-66.
- Reinhardt DH, Rost TL (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany* 35: 563-574.
- Reuscher S, Akiyama M, Mori C, Aoki K, Shibata D, Shiratake K (2013) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Aquaporins in Tomato. *PLoS ONE* 8: e79052.
- Rick C, Holle M (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. *Economic Botany* 44: 69-78.
- Rick CM (1978) The tomato. *Scientific American* 239: 76-87.
- Rich SM, Watt M (2013) Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *Journal of Experimental Botany* 64: 1193-1208.
- Richards RA, Watt M, Rebetzke GJ (2007) Physiological traits and cereal germplasm for sustainable agricultural systems. *Euphytica* 154: 409-425.
- Riederer M, Schreiber L (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of experimental botany* 52: 2023-2032.
- Rieger M, Litvin P (1999) Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy. *Journal of Experimental Botany* 50: 201-209.
- Ristova D, Busch W (2014) Natural variation of root traits: from development to nutrient uptake. *Plant Physiology* 166: 518-527.
- Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel ML (1997) Functional Analysis of Nodulin 26, an Aquaporin in Soybean Root Nodule Symbiosomes. *Journal of Biological Chemistry* 272: 16256-16261.
- Robbins NE, Trontin C, Duan L, Dinneny JR (2014) Beyond the barrier: communication in the root through the endodermis. *Plant physiology* 166: 551-559.

- Romero-Aranda R, Soria T, Cuartero J (2001) Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* 160: 265-272.
- Romero-Aranda R, Soria T, Cuartero J (2002) Greenhouse mist improves yield of tomato plants grown under saline conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 644-648.
- Ron M, Dorrity MW, de Lucas M, Toal T, Hernandez RI, Little SA, Maloof JN, Kliebenstein DJ, Brady SM (2013) Identification of Novel Loci Regulating Interspecific Variation in Root Morphology and Cellular Development in Tomato. *Plant Physiology* 162: 755-768.
- Roppolo D, De Rybel B, Tendon VD, Pfister A, Alassimone J, Vermeer JEM, Yamazaki M, Stierhof Y-D, Beeckman T, Geldner N (2011) A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473: 380-383.
- Rost TL (1996) Tomato, an anatomy atlas. <http://www-plb.ucdavis.edu/labs/rost/tomato/tomhome.html>.
- Russell RS (1977) The growth and form of root systems. En: *Plant root systems: their function and interaction with the soil*. McGraw-Hill. Maidenheadm Berkshire, England. pp 30-61.
- Sade N, Vinocur BJ, Diber A, Shatil A, Ronen G, Nissan H, Wallach R, Karchi H, Moshelion M (2009) Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist* 181: 651-661.
- Sadok W, Sinclair TR (2010) Transpiration response of 'slow-wilting' and commercial soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes to three aquaporin inhibitors. *Journal of Experimental Botany* 61: 821-829.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M (2008) Tissue and Cell-Specific Localization of Rice Aquaporins and Their Water Transport Activities. *Plant and Cell Physiology* 49: 30-39.
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005) Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function. *Plant and Cell Physiology* 46: 1568-1577.

- Sato-Nara K, Nagasaka A, Yamashita H, Ishida J, Enju A, Seki M, Shinozaki K, Suzuki H (2004) Identification of genes regulated by dark adaptation and far-red light illumination in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 27: 1387-1394.
- Saure MC (2001) Blossom-end rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) — a calcium- or a stress-related disorder? *Scientia Horticulturae* 90: 193-208.
- Schäffner AR (1998) Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204: 131-139.
- Schneider UA, Havlík P, Schmid E, Valin H, Mosnier A, Obersteiner M, Böttcher H, Skalský R, Balkovič J, Sauer T, Fritz S (2011) Impacts of population growth, economic development, and technical change on global food production and consumption. *Agricultural Systems* 104: 204-215.
- Schreiber L (1996) Chemical composition of Casparian strips isolated from *Clivia miniata* Reg. roots: evidence for lignin. *Planta* 199: 596-601.
- Schreiber L (2010) Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* 15: 546-553.
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K (2007) Chemical composition of apoplastic transport barriers in roots. En: Sattelmacher B, Horst W (eds). *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*. Springer. Heidelberg, Germany. pp 109-117.
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabbs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* 50: 1267-1280.
- Schreiber U, Hormann H, Neubauer C, Klughammer C (1995) Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Functional Plant Biology* 22: 209-220.
- Secchi F, Zwieniecki MA (2010) Patterns of PIP gene expression in *Populus trichocarpa* during recovery from xylem embolism suggest a major role for the PIP1 aquaporin subfamily as moderators of refilling process. *Plant, Cell & Environment* 33: 1285-1297.
- Serra O, Soler M, Hohn C, Sauveplane V, Pinot F, Franke R, Schreiber L, Prat S, Molinas M, Figueras M (2009) CYP86A33-Targeted Gene Silencing in Potato Tuber Alters Suberin Composition, Distorts Suberin Lamellae, and Impairs the Periderm's Water Barrier Function. *Plant Physiology* 149: 1050-1060.

- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R (2002) PIP1 Plasma Membrane Aquaporins in Tobacco: From Cellular Effects to Function in Plants. *The Plant Cell* 14: 869-876.
- Soto-García M, Martínez-Alvarez V, García-Bastida PA, Alcon F, Martín-Gorriz B (2013) Effect of water scarcity and modernisation on the performance of irrigation districts in south-eastern Spain. *Agricultural Water Management* 124: 11-19.
- Stanfield W (1971) *Genética. Teoría y 400 problemas resueltos. Serie Schaum.* McGraw Hill. México.
- Stanghellini M, Rasmussen S (1994) Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant disease* 78: 1129-1138.
- Steele KA, Virk DS, Kumar R, Prasad SC, Witcombe JR (2007) Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. *Field Crops Research* 101: 180-186.
- Steudle E (1989) Water flow in plants and its coupling to other processes: An overview. *Methods in Enzymology* 174: 183-225.
- Steudle E (2000) Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and Soil* 226: 45-56.
- Steudle E (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annual Review of Plant Biology* 52: 847-875.
- Steudle E, Frensch J (1996) Water transport in plants: Role of the apoplast. *Plant and Soil* 187: 67-79.
- Steudle E, Peterson CA (1998) How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49: 775-788.
- Stradiot P (2003) Cultivos sin suelos: evolución y situación actual en Europa y la región mediterránea. En: Fernández M, Lorenzo P, Cuadrado I (eds). *Mejora de la eficiencia en el uso del agua en cultivos protegidos.* Dirección General de Investigación y Formación Agraria de la Junta de Andalucía, Cajamar. Almería. pp 37-54.
- Suga S, Maeshima M (2004) Water Channel Activity of Radish Plasma Membrane Aquaporins Heterologously Expressed in Yeast and Their Modification by Site-Directed Mutagenesis. *Plant and Cell Physiology* 45: 823-830.

- Suku S, Knipfer T, Fricke W (2014) Do root hydraulic properties change during the early vegetative stage of plant development in barley (*Hordeum vulgare*)? *Annals of botany* 113: 385-402.
- Tahi H, Wahbi S, Wakrim R, Aganchich B, Serraj R, Centritto M (2007) Water relations, photosynthesis, growth and water-use efficiency in tomato plants subjected to partial rootzone drying and regulated deficit irrigation. *Plant Biosystems* 141: 265-274.
- Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant Physiology* (5th Edn). Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T (2006) The *Arabidopsis* Major Intrinsic Protein NIP5;1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation. *The Plant Cell* 18: 1498-1509.
- Takase T, Ishikawa H, Murakami H, Kikuchi J, Sato-Nara K, Suzuki H (2011) The Circadian Clock Modulates Water Dynamics and Aquaporin Expression in *Arabidopsis* Roots. *Plant and Cell Physiology* 52: 373-383.
- Tambussi EA, Bort J, Araus JL (2007) Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology* 150: 307-321.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tazawa M, Ohkuma E, Shibasaka M, Nakashima S (1997) Mercurial-sensitive water transport in barley roots. *Journal of Plant Research* 110: 435-442.
- The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.
- Thomas R, Fang X, Ranathunge K, Anderson TR, Peterson CA, Bernards MA (2007) Soybean Root Suberin: Anatomical Distribution, Chemical Composition, and Relationship to Partial Resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology* 144: 299-311.
- Thompson AJ, Andrews J, Mulholland BJ, McKee JMT, Hilton HW, Horridge JS, Farquhar GD, Smeeton RC, Smillie IRA, Black CR, Taylor IB (2007) Overproduction of Absciscic Acid in Tomato Increases Transpiration Efficiency and Root Hydraulic Conductivity and Influences Leaf Expansion. *Plant Physiology* 143: 1905-1917.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thompson NP, Heimsch C (1964) Stem anatomy and aspects of development in tomato. *American Journal of Botany*: 7-19.
- Tognoni F (2003) El desarrollo de los sistemas de cultivo en horticultura protegida. En: Fernández M, Lorenzo P, Cuadrado I (eds). *Mejora de la eficiencia en el uso del agua en cultivos protegidos*. Dirección General de Investigación y Formación Agraria de la Junta de Andalucía, Cajamar. Almería. pp 11-24.
- Tombesi S, Johnson RS, Day KR, DeJong TM (2010) Relationships between xylem vessel characteristics, calculated axial hydraulic conductance and size-controlling capacity of peach rootstocks. *Annals of Botany* 105: 327-331.
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694.
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu D-T, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393-397.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti M, Maccaferri M, Giuliani S, Landi P (2003) Searching for quantitative trait loci controlling root traits in maize: a critical appraisal. En: Abe J (ed). *Roots: The Dynamic Interface between Plants and the Earth*. Springer Heidelberg, Germany. pp 35-54.
- Tuberosa R, Sanguineti M, Landi P, Michela Giuliani M, Salvi S, Conti S (2002) Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Molecular Biology* 48: 697-712.
- Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* 50: 1055-1071.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* 25: 173-194.
- Tyree MT (2003) Plant hydraulics: The ascent of water. *Nature* 423: 923-923.

- Tyree MT, Ewers FW (1991) The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* 119: 345-360.
- Tyree MT, Jarvis PG (1982) Water in Tissues and Cells. En: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds). *Physiological Plant Ecology II*. Springer. Heidelberg, Germany. pp 35-77.
- Tyree MT, Sperry JS (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual review of plant biology* 40: 19-36.
- Tyree MT, Velez V, Dalling J (1998) Growth dynamics of root and shoot hydraulic conductance in seedlings of five neotropical tree species: scaling to show possible adaptation to differing light regimes. *Oecologia* 114: 293-298.
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R (2008) Function of *Nicotiana tabacum* Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO₂ Permeability. *The Plant Cell* 20: 648-657.
- Uga Y, Okuno K, Yano M (2008) QTLs underlying natural variation in stele and xylem structures of rice root. *Breeding Science* 58: 7-14.
- Urdanoz V, Amezketa E, Laborda IC, Ochoa V, Lafarga RA (2008) Mobile and georeferenced electromagnetic sensors and applications for salinity assessment. *Spanish Journal of Agricultural Research*: 469-478.
- Urrestarazu M (2011) State of the Art and new Trends of Soilless culture in Spain and in emerging countries. *International Symposium on Growing Media, Composting and Substrate Analysis* 1013. 305-312.
- van den Honert T (1948) Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Society* 3: 146-153.
- Vandeleur RK, Mayo G, Shelden MC, Gilliam M, Kaiser BN, Tyerman SD (2009) The Role of Plasma Membrane Intrinsic Protein Aquaporins in Water Transport through Roots: Diurnal and Drought Stress Responses Reveal Different Strategies between Isohydric and Anisohydric Cultivars of Grapevine. *Plant Physiology* 149: 445-460.
- Vandeleur RK, Sullivan W, Athman A, Jordans C, Gilliam M, Kaiser BN, Tyerman SD (2014) Rapid shoot-to-root signalling regulates root hydraulic conductance via aquaporins. *Plant, Cell & Environment* 37: 520-538.
- Visser E, Cohen JD, Barendse G, Blom C, Voesenek L (1996) An Ethylene-Mediated Increase in Sensitivity to Auxin Induces Adventitious Root Formation in Flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology* 112: 1687-1692.

- Volokita M, Rosilio-Brami T, Rivkin N, Zik M (2011) Combining Comparative Sequence and Genomic Data to Ascertain Phylogenetic Relationships and Explore the Evolution of the Large GDSL-Lipase Family in Land Plants. *Molecular Biology and Evolution* 28: 551-565.
- Wachsman G, Sparks EE, Benfey PN (2015) Genes and networks regulating root anatomy and architecture. *New Phytologist* 208: 26-38.
- Wallace IS, Roberts DM (2004) Homology Modeling of Representative Subfamilies of Arabidopsis Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic/Arginine Selectivity Filter. *Plant Physiology* 135: 1059-1068.
- Wan X, Zwiazek JJ (1999) Mercuric chloride effects on root water transport in aspen seedlings. *Plant Physiology* 121: 939-946.
- Wasson AP, Richards RA, Chatrath R, Misra SC, Prasad SVS, Rebetzke GJ, Kirkegaard JA, Christopher J, Watt M (2012) Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. *Journal of Experimental Botany* 63: 3485-3498.
- Wegner LH (2014) Root pressure and beyond: energetically uphill water transport into xylem vessels? *Journal of Experimental Botany* 65: 381-393.
- Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U, Schmülling T (2010) Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. *The Plant Cell* 22: 3905-3920.
- Wuyts N, Dhondt S, Inzé D (2015) Measurement of plant growth in view of an integrative analysis of regulatory networks. *Current Opinion in Plant Biology* 25: 90-97.
- Xi B, Wang Y, Jia L, Bloomberg M, Li G, Di N (2013) Characteristics of fine root system and water uptake in a triploid *Populus tomentosa* plantation in the North China Plain: Implications for irrigation water management. *Agricultural Water Management* 117: 83-92.
- Ye Q, Steudle E (2006) Oxidative gating of water channels (aquaporins) in corn roots. *Plant, Cell & Environment* 29: 459-470.
- Ye Z-H (2002) Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 183-202.
- Zeier J, Goll A, Yokoyama M, Karahara I, Schreiber L (1999) Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. *Plant, Cell & Environment* 22: 271-279.

- Zeier J, Schreiber L (1997) Chemical Composition of Hypodermal and Endodermal Cell Walls and Xylem Vessels Isolated from *Clivia miniata* (Identification of the Biopolymers Lignin and Suberin). *Plant Physiology* 113: 1223-1231.
- Zelazny E, Miecielica U, Borst JW, Hemminga MA, Chaumont F (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *The Plant Journal* 57: 346-355.
- Zeuthen T (2010) Water-transporting proteins. *Journal of Membrane Biology* 234: 57-73.
- Zhan A, Schneider H, Lynch J (2015) Reduced lateral root branching density improves drought tolerance in maize. *Plant Physiology* 168: 1603-1615.
- Zhang WH, Tyerman SD (1999) Inhibition of Water Channels by HgCl₂ in Intact Wheat Root Cells. *Plant Physiology* 120: 849-858.
- Zhang Z, Xu P, Shao H, Liu M, Fu Z, Chu L (2011) Advances and prospects: Biotechnologically improving crop water use efficiency. *Critical Reviews in Biotechnology* 31: 281-293.
- Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schäffner AR (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *Journal of Experimental Botany* 56: 2971-2981.
- Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210: 302-311.
- Zimmermann HM, Steudle E (1998) Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206: 7-19.
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Haase A (2004) Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* 162: 575-615.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

